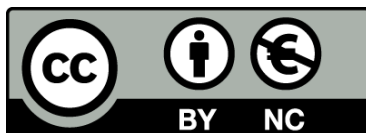




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Desarrollo de un nuevo medicamento hormonal: comprimidos de estrógenos conjugados

Manel Aparici Dealbert



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

**DESARROLLO DE UN NUEVO MEDICAMENTO
HORMONAL: COMPRIMIDOS DE ESTROGENOS
CONJUGADOS**

Manuel Aparici Dealbert
Año 2008

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701432094

Esfuézate en tu quehacer
como si de cada detalle que pienses,
de cada palabra que digas,
de cada pieza que pongas,
de cada golpe de tu martillo,
dependiera la salvación de la humanidad.
Pues depende, créelo.

Fragmento de "Elogio del vivir" (1909)
Joan Maragall (1860-1911)

Dedicado a mis padres y familia por apoyarme en todo momento y animarme a
conseguir mis metas en la vida.

Agradecimientos a todos mis compañeros de trabajo que me han animado a
finalizar la tesis doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE

OBJETIVO

PARTE BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DEL PRINCIPIO ACTIVO..... 7

1.1	INTRODUCCIÓN.....	7
1.2	EFFECTOS FARMACOLÓGICOS	9
1.2.1	Efectos sobre las glándulas endocrinas.....	9
1.2.2	Efectos sobre la presión sanguínea.....	10
1.2.3	Efectos sobre la tiroides.....	10
1.2.4	Efectos sobre la corteza suprarrenal	10
1.2.5	Efectos sobre el sistema reproductor	10
1.2.6	Efectos sobre las glándulas mamarias	10
1.2.7	Efectos sobre el sistema cardiovascular.....	11
1.2.8	Efectos sobre los niveles de los lípidos sanguíneos.....	11
1.2.9	Efectos sobre el metabolismo	11
1.2.10	Efectos sobre la piel y mucosas.....	11
1.2.11	Efectos sobre la masa esquelética.....	11
1.2.12	Efectos sobre los electrolitos	12
1.2.13	Efectos sobre el SNC.....	12
1.2.14	Efectos sobre el sistema inmune.....	12
1.3	MECANISMO DE ACCION	12
1.4	FARMACOCINETICA	12
1.4.1	Absorción	12
1.4.2	Distribución	13
1.4.3	Metabolismo y excreción.....	13
1.4.3.1	Niveles plasmáticos	14

1.5	INTERACCIONES	15
1.6	INDICACIONES Y USO	15
1.6.1	Bases del tratamiento sustitutivo con estrógenos:	15
1.6.2	Tratamiento de los síntomas vasomotores con estrógenos	16
1.6.3	Tratamiento de la atrofia urogenital	16
1.6.4	Tratamiento de la osteoporosis	17
1.7	ADMINISTRACION Y DOSIFICACION	17
1.7.1	Dosificación	18
1.8	EFFECTOS ADVERSOS.....	18
1.9	TERATOGENICIDAD	19
1.10	CANCEROGENESIS.....	19
1.10.1	Cáncer de endometrio	19
1.10.2	Cáncer de mama	19
1.11	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	20
1.12	CONTRAINDICACIONES Y RECOMENDACIONES.....	20
1.13	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FISICOQUÍMICAS	21
1.13.1	Nomenclatura	21
1.13.2	Descripción.....	21
1.13.2.1	Forma física	21
1.13.2.2	Forma estructural	21
1.13.3	Solubilidad	22
1.13.4	Perfil de Impurezas	23
1.13.5	Conservación	24

CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DE LA FORMA FARMACÉUTICA 25

2.1 INTRODUCCIÓN..... 25

2.2 SISTEMAS ORALES DE LIBERACIÓN CONTROLADA..... 28

2.2.1 Sistema con liberación continua del principio activo..... 28

2.2.1.1 Sistemas osmóticos 28

2.2.1.2 Sistemas con membrana microporosa..... 29

2.2.1.3 Formulaciones pH dependientes 30

2.2.1.4 Matrices hidrofílicas 30

2.2.1.5 Matrices lipídicas 31

2.2.1.6 Resinas cambiadores de iones 32

2.2.2 Sistemas con tránsito gastrointestinal retardado y liberación continua 33

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3: ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL PRINCIPIO ACTIVO ... 37

3.1 INTRODUCCIÓN..... 37

3.2 DEFINICIÓN 37

3.3 ESPECIFICACIONES 38

3.4 MATERIAL 39

3.5 MÉTODOS..... 41

3.5.1 Características organolépticas 41

3.5.2 Solubilidad 41

3.5.3 Identificación de sodio 41

3.5.4 Identificación de sulfato 42

3.5.5	Identificación y valoración de la materia prima e impurezas	42
3.5.5.1	Condiciones cromatograficas.....	42
3.5.5.2	Soluciones necesarias	42
3.5.5.3	Soluciones para la identificación individual	43
3.5.5.4	Soluciones de cuantificación	46
3.5.5.5	Procedimiento	47
3.5.5.6	Cálculos	47
3.5.5.6.1	Calculos de los estrógenos libres	47
3.5.5.7	Especificaciones	48
3.5.6	Contenido trometamol	48
3.5.6.1	Especificaciones	49
3.5.7	Contenido de cloruro de sodio	49
3.5.7.1	Especificaciones	49
3.5.8	Humedad	49
3.5.8.1	Especificación	49
3.5.9	Resultados obtenidos.....	49
3.5.10	Conclusiones.....	50

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA FORMULACIÓN Y TÉCNICA DE ELABORACIÓN..... 51

4.1 INTRODUCCIÓN..... 51

4.2 MATERIAL 52

4.2.1 Materias primas 52

4.2.1.1 Lactosa monohidrato y anhidra 52

4.2.1.1.1 Categoría funcional..... 52

4.2.1.1.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas 52

4.2.1.1.3 Estabilidad 52

4.2.1.1.4 Incompatibilidades 52

4.2.1.1.5 Conclusiones 52

4.2.1.2 Celulosa microcristalina 53

4.2.1.2.1 Categoría funcional..... 53

4.2.1.2.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas 53

4.2.1.2.3	Estabilidad	53
4.2.1.2.4	Incompatibilidades	53
4.2.1.2.5	Conclusiones	53
4.2.1.3	Povidona	53
4.2.1.3.1	Categoría funcional.....	53
4.2.1.3.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	53
4.2.1.3.3	Estabilidad	54
4.2.1.3.4	Incompatibilidades	54
4.2.1.3.5	Conclusiones	54
4.2.1.4	Hipromelosa o hidroxipropilmetilcelulosa	54
4.2.1.4.1	Categoría funcional.....	54
4.2.1.4.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	54
4.2.1.4.3	Estabilidad	55
4.2.1.4.4	Incompatibilidades	55
4.2.1.4.5	Conclusiones	55
4.2.1.5	Silice coloidal anhidra	55
4.2.1.5.1	Categoría funcional.....	55
4.2.1.5.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	55
4.2.1.5.3	Estabilidad	56
4.2.1.5.4	Incompatibilidades	56
4.2.1.5.5	Conclusiones	56
4.2.1.6	Talco	56
4.2.1.6.1	Categoría funcional.....	56
4.2.1.6.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	56
4.2.1.6.3	Estabilidad	56
4.2.1.6.4	Incompatibilidades	56
4.2.1.6.5	Conclusiones	56
4.2.1.7	Estearato de magnesio	57
4.2.1.7.1	Categoría funcional.....	57
4.2.1.7.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	57
4.2.1.7.3	Estabilidad	57
4.2.1.7.4	Incompatibilidades	57
4.2.1.7.5	Conclusiones	57
4.2.1.8	Etilcelulosa	57

4.2.1.8.1	Categoría funcional.....	57
4.2.1.8.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	57
4.2.1.8.3	Estabilidad	57
4.2.1.8.4	Incompatibilidades	58
4.2.1.8.5	Conclusiones	58
4.2.1.9	Trietilcitrate	58
4.2.1.9.1	Categoría funcional.....	58
4.2.1.9.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	58
4.2.1.9.3	Estabilidad	58
4.2.1.9.4	Incompatibilidades	58
4.2.1.9.5	Conclusiones	58
4.2.1.10	Dióxido de titanio	58
4.2.1.10.1	Categoría funcional.....	58
4.2.1.10.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	58
4.2.1.10.3	Estabilidad	59
4.2.1.10.4	Incompatibilidades	59
4.2.1.10.5	Conclusiones	59
4.2.1.11	Lauril sulfato sódico	59
4.2.1.11.1	Categoría funcional.....	59
4.2.1.11.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	59
4.2.1.11.3	Estabilidad	59
4.2.1.11.4	Incompatibilidades	59
4.2.1.11.5	Conclusiones	59
4.2.1.12	Polimetacrilatos.....	60
4.2.1.12.1	Categoría funcional.....	60
4.2.1.12.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	60
4.2.1.12.3	Estabilidad	60
4.2.1.12.4	Incompatibilidades	60
4.2.1.12.5	Conclusiones	60
4.2.1.13	Fosfato bicálcico	60
4.2.1.13.1	Categoría funcional.....	60
4.2.1.13.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	60
4.2.1.13.3	Estabilidad	60
4.2.1.13.4	Incompatibilidades	61

4.2.1.13.5	Conclusiones	61
4.2.1.14	Glicolato sódico de almidón	61
4.2.1.14.1	Categoría funcional	61
4.2.1.14.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	61
4.2.1.14.3	Estabilidad	61
4.2.1.14.4	Incompatibilidades	61
4.2.1.14.5	Conclusiones	61
4.2.1.15	Aceite de ricino	61
4.2.1.15.1	Categoría funcional	61
4.2.1.15.2	Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas	61
4.2.1.15.3	Estabilidad	62
4.2.1.15.4	Incompatibilidades	62
4.2.1.15.5	Conclusiones	62
4.2.2	Estándares	62
4.2.3	Disolventes	62
4.2.4	Reactivos	62
4.2.5	Material de laboratorio	62
4.2.6	Equipos	63
4.3	METODOLOGÍA	63
4.3.1	Determinación de la capacidad de flujo	64
4.3.1.1	Procedimiento	64
4.3.1.2	Expresión de los resultados	65
4.3.2	Determinación del ángulo de reposo	65
4.3.2.1	Procedimiento	65
4.3.2.2	Expresión de los resultados	66
4.3.3	Ensayo de densidad aparente sin compactar y compactada	66
4.3.3.1	Procedimiento	66
4.3.3.2	Expresión de los resultados	66
4.3.4	Humedad	67
4.3.4.1	Procedimiento	67
4.3.4.2	Expresión de los resultados	67
4.3.5	Uniformidad de masa	67
4.3.5.1	Procedimiento	67

4.3.5.2	Expresión de los resultados	68
4.3.6	Resistencia a la rotura	68
4.3.6.1	Procedimiento	68
4.3.6.2	Expresión de los resultados	68
4.3.7	Ensayo de Friabilidad	69
4.3.7.1	Procedimiento	69
4.3.7.2	Expresión de los resultados	69
4.3.8	Contenido	69
4.3.8.1	Condiciones cromatográficas	69
4.3.8.2	Soluciones necesarias	70
4.3.8.2.1	Solución de estrógenos conjugados	70
4.3.8.2.2	Solución de estándar interno	70
4.3.8.2.3	Solución de estándar	70
4.3.8.2.4	Solución problema	70
4.3.8.3	Desarrollo cromatográfico	71
4.3.8.4	Expresión de los resultados	71
4.3.8.5	Especificaciones	71
4.3.9	Uniformidad de contenido	71
4.3.9.1	Soluciones necesarias	71
4.3.9.1.1	Solución estándar	71
4.3.9.1.2	Solución de estándar interno	71
4.3.9.1.3	Solución de referencia	71
4.3.9.1.4	Solución problema	72
4.3.9.2	Expresión de los resultados	72
4.3.9.3	Especificaciones	72
4.3.10	Ensayo de disolución	73
4.3.10.1	Condiciones del ensayo	73
4.3.10.2	Condiciones cromatograficas	73
4.3.10.3	Soluciones necesarias	73
4.3.10.3.1	Solución estándar	73
4.3.10.3.2	Solución problema	74
4.3.10.4	Desarrollo cromatográfico	74
4.3.10.5	Expresión de los resultados	74

4.4 FORMULACIONES Y TÉCNICAS DE ELABORACIÓN.....	74
4.4.1 Formulaciones de la serie 10	74
4.4.1.1 Metodología	75
4.4.1.1.1 Elaboración del núcleo.....	75
4.4.1.1.2 Recubrimiento de los núcleos.....	76
4.4.1.2 Resultados	76
4.4.1.2.1 Formulación 10	77
4.4.1.2.2 Formulación 11	77
4.4.1.2.3 Formulación 12	78
4.4.1.3 Discusión	79
4.4.2 Formulaciones de la Serie 20.....	79
4.4.2.1 Metodología	80
4.4.2.1.1 Elaboración del núcleo.....	80
4.4.2.1.2 Recubrimiento de los núcleos.....	81
4.4.2.2 Resultados	81
4.4.2.2.1 Formulación 20	82
4.4.2.2.2 Formulación 21	83
4.4.2.2.3 Formulación 22	84
4.4.2.3 Discusión	85
4.4.3 Formulaciones de la serie experimental 30	86
4.4.3.1 Metodología	86
4.4.3.1.1 Elaboración del núcleo.....	86
4.4.3.2 Resultados	87
4.4.3.2.1 Formulación 30	87
4.4.3.2.2 Formulación 31	88
4.4.3.2.3 Formulación 32	88
4.4.3.3 Discusión	89
4.4.4 Formulaciones de la serie 40	89
4.4.4.1 Metodología	90
4.4.4.1.1 Elaboración del núcleo.....	90
4.4.4.2 Resultados	90
4.4.4.2.1 Formulación 40	91
4.4.4.2.2 Formulación 41	91
4.4.4.2.3 Formulación 42	92

4.4.4.3	Discusión	92
4.4.5	Formulaciones de la Serie 50	93
4.4.5.1	Metodología	94
4.4.5.1.1	Elaboración del núcleo por compresión directa	94
4.4.5.1.2	Elaboración del núcleo por compresión previa granulación húmeda	94
4.4.5.2	Resultados	95
4.4.5.2.1	Formulación 50	95
4.4.5.2.2	Formulación 51	96
4.4.5.2.3	Formulación 52	96
4.4.5.3	Discusión	97
4.4.5.4	Formulación del recubrimiento	98
4.4.5.5	Metodología	98
4.4.5.5.1	Resultados	99
4.4.5.6	Discusión	100

CAPÍTULO 5: PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR HPLC..... 101

5.1	INTRODUCCIÓN.....	101
5.1.1	Idoneidad del sistema (system suitability)	103
5.1.2	Selectividad	104
5.1.3	Linealidad e intervalo.....	104
5.1.4	Precisión	104
5.1.5	Limite de detección y cuantificación	105
5.2	MATERIAL	105
5.3	MÉTODOS.....	106
5.3.1	Validación del método analítico para la valoración de la materia prima e impurezas	106
5.3.1.1	Descripción del método.....	106
5.3.1.1.1	Condiciones cromatograficas.....	106
5.3.1.1.2	Soluciones auxiliares	107
5.3.1.1.3	Soluciones para la identificación individual.....	107

5.3.1.1.4	Soluciones de cuantificación.....	110
5.3.1.1.5	Procedimiento.....	111
5.3.1.2	Parámetros a validar	112
5.3.1.2.1	Idoneidad del sistema	112
5.3.1.2.1.1	Soluciones necesarias	112
5.3.1.2.1.2	Expresión de los resultados	112
5.3.1.2.2	Selectividad	112
5.3.1.2.2.1	Soluciones necesarias	112
5.3.1.2.2.1.1	Identificación individual de cada estrógeno	112
5.3.1.2.2.1.2	Identificación del analito	112
5.3.1.2.2.1.3	Ausencia de interferencia del estándar interno.....	112
5.3.1.2.2.1.4	Ausencia de interferencia en una materia prima sometida a stress.....	113
5.3.1.2.2.2	Tratamiento de datos	113
5.3.1.2.3	Linealidad	113
5.3.1.2.3.1	Tratamiento de los resultados.....	113
5.3.1.2.3.1.1	Recta de regresión	114
5.3.1.2.3.1.2	Coefficiente de correlación y determinación	114
5.3.1.2.3.1.3	Test de linealidad.....	114
5.3.1.2.3.1.4	Coefficientes de variación de los factores respuesta (f)	114
5.3.1.2.4	Precisión	116
5.3.1.2.4.1	Repetibilidad del sistema instrumental.....	116
5.3.1.2.4.1.1	Tratamiento de los datos	116
5.3.1.2.4.2	Repetibilidad del método	116
5.3.1.2.4.2.1	Tratamiento de los datos	116
5.3.1.2.4.3	Precisión Intermedia	116
5.3.1.2.4.3.1	Precisión interdía	116
5.3.1.2.4.3.2	Precisión interanalista.....	117
5.3.1.2.5	Exactitud	117
5.3.1.2.5.1	Tratamiento de los datos	117
5.3.2	Validación del método analítico para los ensayos de uniformidad y contenido	118
5.3.2.1	Descripción del método.....	118
5.3.2.1.1	Condiciones cromatográficas.....	118
5.3.2.1.2	Soluciones necesarias.....	118

5.3.2.1.2.1 Solución de estrógenos conjugados	118
5.3.2.1.2.2 Solución de estándar interno	118
5.3.2.1.2.3 Solución de estándar	119
5.3.2.1.2.4 Solución problema	119
5.3.2.1.3 Desarrollo cromatográfico	119
5.3.2.2 Parámetros a validar	119
5.3.2.2.1 Idoneidad del sistema	119
5.3.2.2.1.1 Soluciones necesarias	119
5.3.2.2.1.2 Expresión de los resultados	120
5.3.2.2.2 Selectividad	120
5.3.2.2.2.1 Soluciones necesarias	120
5.3.2.2.2.1.1 Identificación del analito	120
5.3.2.2.2.1.2 Ausencia de interferencia de los excipientes	120
5.3.2.2.2.1.3 Ausencia de interferencia del estándar interno	120
5.3.2.2.2.1.4 Ausencia de interferencia en una muestra sometida a stress	121
5.3.2.2.2.2 Tratamiento de datos	121
5.3.2.2.3 Linealidad	121
5.3.2.2.3.1 Soluciones necesarias	121
5.3.2.2.3.1.1 Solución de estándar interno	121
5.3.2.2.3.1.2 Solución 50%	121
5.3.2.2.3.1.3 Solución 75%	122
5.3.2.2.3.1.4 Solución 100%	122
5.3.2.2.3.1.5 Solución 125%	122
5.3.2.2.3.1.6 Solución 150%	122
5.3.2.2.3.2 Soluciones para evaluar la linealidad	122
5.3.2.2.3.3 Tratamiento de los resultados	122
5.3.3 Validación del método analítico para el ensayo de disolución	123
5.3.3.1 Descripción del método	123
5.3.3.1.1 Condiciones del ensayo	123
5.3.3.1.2 Condiciones cromatograficas	123
5.3.3.1.3 Soluciones necesarias	123
5.3.3.1.3.1 Solución estándar	123
5.3.3.1.3.2 Solución problema	123
5.3.3.1.4 Desarrollo cromatográfico	124

5.3.3.2	Parámetros a validar	124
5.3.3.2.1	Selectividad	124
5.3.3.2.1.1	Soluciones necesarias	124
5.3.3.2.1.1.1	Identificación del principio activo	124
5.3.3.2.1.1.2	Ausencia de interferencia de los excipientes	124
5.3.3.2.1.1.3	Ausencia de interferencia en una muestra sometida a stress	124
5.3.3.2.1.2	Tratamiento de datos	125

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 125

5.4.1	Resultados de la Validación del método analítico para la valoración de la materia prima e impurezas	125
5.4.1.1	Idoneidad del sistema	126
5.4.1.2	Selectividad.....	128
5.4.1.2.1	Identificación de los estrógenos individuales	128
5.4.1.3	Linealidad del método	136
5.4.1.3.1	Estrona	136
5.4.1.3.2	Equilina	139
5.4.1.3.3	17 α -dihidroequilina	143
5.4.1.3.4	17 β -dihidroequilina	146
5.4.1.3.5	17 α -estradiol	150
5.4.1.3.6	17 β -estradiol	153
5.4.1.3.7	17 α -dihidroequilenina	154
5.4.1.3.8	17 β -dihidroequilenina	156
5.4.1.3.9	Equilenina	157
5.4.1.4	Resultados y discusión de la precisión	158
5.4.1.4.1	Repetibilidad del sistema instrumental	158
5.4.1.4.2	Repetibilidad del método	160
5.4.1.4.3	Precisión intermedia	161
5.4.1.5	Exactitud	166
5.4.1.6	Límite de cuantificación y límite de detección	175
5.4.2	Resultados de la Validación del método analítico para la valoración del producto acabado.....	175
5.4.2.1	Idoneidad del sistema	176
5.4.2.2	Selectividad.....	178

5.4.2.2.1	Identificación del principio activo	178
5.4.2.2.2	Ausencia de interferencias del estándar interno	181
5.4.2.2.3	Ausencia de interferencias de los excipientes	181
5.4.2.2.4	Muestra sometida a stress.....	181
5.4.2.3	Linealidad del método	182
5.4.2.3.1	Linealidad de la estrona sulfato sódico.....	182
5.4.2.3.2	Linealidad de la equilina sulfato sódico	185
5.4.3	Resultados y discusión de la precisión	189
5.4.3.1	Repetibilidad del sistema instrumental.....	189
5.4.3.2	Repetibilidad de la solución de estándar.....	190
5.4.3.3	Repetibilidad de la solución problema.....	191
5.4.3.4	Precisión intermedia.....	192
5.4.4	Resultados y discusión de la exactitud	194
5.4.5	Resultados de la Validación del método analítico para el ensayo de disolución	197
5.4.5.1	Identificación del principio activo.....	197
5.4.5.2	Ausencia de interferencias de los excipientes	198
5.4.5.3	Muestra sometida a stress	199

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES.....201

6.1 INTRODUCCIÓN..... 201

6.2 OBJETIVO..... 203

6.3 METODOLOGÍA..... 203

6.3.1 Diseño del estudio

6.3.2 Material.....204

6.3.3 Métodos

6.4 ESPECIFICACIONES

205

6.5	EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS	206
6.5.1	Características organolépticas	206
6.5.2	Humedad.....	206
6.5.2.1	Uniformidad de masa	206
6.5.2.2	Contenido de estrona sulfato sódico	207
6.5.2.3	Contenido de equilina sulfato sódico	207
6.5.2.4	Perfil estrogénico	208
6.5.2.5	Ensayo de disolución	208
6.5.3	Resultados.....	208
6.5.3.1	Resultados estadístico del ensayo de humedad.....	224
6.5.3.2	Resultados del estudio estadísticos para ensayo de uniformidad de peso.....	230
6.5.3.3	Resultados estadístico para el contenido en Estrona	236
6.5.3.4	Resultados estadísticos para el contenido en Equilina	244
6.5.3.5	Resultados estadísticos para el perfil estrogénico EQ/ES	253
6.5.3.6	Resultados estadísticos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES.....	261
6.5.3.7	Resultados estadísticos para el ensayo de velocidad de disolución.....	269
6.6	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD.....	281
6.6.1	Aspecto	281
6.6.2	Ensayo de humedad	282
6.6.2.1	Estudio a corto plazo.....	282
6.6.2.2	Estudio a largo plazo.....	283
6.6.3	Uniformidad de masa.....	284
6.6.4	Estudio del contenido en estrona.....	285
6.6.4.1	Estudio a corto plazo.....	285
6.6.4.2	Estudio a largo plazo.....	287
6.6.5	Estudio del contenido en equilina	288
6.6.5.1	Estudio a corto plazo.....	289
6.6.5.2	Estudio a largo plazo.....	290
6.6.6	Perfil estrogénico EQ/ES	291
6.6.6.1	Estudio a corto plazo.....	292
6.6.7	Estudio a largo plazo	293
6.6.8	Perfil estrogénico α-dihidroEQ/ES.....	295

6.6.8.1	Estudio a corto plazo.....	295
6.6.8.2	Estudio a largo plazo.....	296
6.6.9	Estudio del ensayo de velocidad de disolución	298
6.6.9.1	Estudio a corto plazo.....	298
6.6.9.2	Estudio a largo plazo.....	299
6.7	CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD.....	300
	CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	305
	CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFIA.....	311

OBJETIVO

OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio es el desarrollo de un nuevo medicamento en forma de comprimidos de 0.625 mg de estrógenos conjugados que posean una liberación "in vitro" del principio activo que cumpla con las especificaciones indicadas en la USP 29 y a su vez dé lugar a un medicamento estable, seguro y eficaz.

Para consolidar el objetivo principal se han establecido unos objetivos secundarios pero totalmente necesarios. Estos objetivos son los siguientes:

- Estudio y establecimiento de las características fisicoquímicas y biofarmacéuticas que debe cumplir el principio activo, estrógenos conjugados, para la obtención de una formulación adecuada.
- Estudio de los excipientes susceptibles de utilizarse para el diseño de la formulación.
- Diseño de la formulación y técnica de elaboración más adecuada en función de las características que debe cumplir la formulación.

- Una exigencia para alcanzar los objetivos secundarios es la investigación y desarrollo de una metodología analítica que nos permita la correcta determinación cualitativa y cuantitativa del principio activo en el producto acabado.
- Estudio de estabilidad de las formulaciones más idóneas en condiciones forzadas como a tiempo real por un mínimo de un año, siguiendo los criterios establecidos en las normas ICH.

PARTE BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DEL PRINCIPIO ACTIVO

1.1 INTRODUCCIÓN

La terapia hormonal de reemplazo se inició a principios del siglo XX, cuando se administró por primera vez extractos ováricos. El primer estrógeno comercial se introdujo en el arsenal terapéutico a principios de la década de los treinta, inicialmente estos compuestos fueron elaborados con fines anticonceptivos, pero posteriormente fármacos menos potentes o cantidades menores se han utilizado para el tratamiento de los síntomas relacionados con el climaterio. A principios de la década de los cuarenta se comercializó el primer preparado para la terapia hormonal de reemplazo compuesto por estrógenos conjugados de origen equino.

En los últimos años la terapia hormonal de reemplazo ha sufrido numerosas críticas debido al aumento de riesgo de producir cáncer de endometrio, cáncer de mama, trombosis, cardiopatías e hipertensión. Sin embargo, analizando diferentes variables individuales del paciente, tipo de estrógeno, dosis, pauta de dosificación y vía administración se puede llegar a una prescripción adecuada con la cual los beneficios sean superiores a los riesgos.

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos, que contienen un anillo fenólico (A) con un grupo hidroxilo en el C₃ y un grupo β-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (figura 1.1). El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a los receptores estrogénicos (1,2). Casi todas las sustituciones alquilo en el anillo fenólico A alteran esa unión pero las sustituciones en el anillo C o D no la afectan. Las sustituciones etinil en la posición C₁₇ incrementan la potencia.

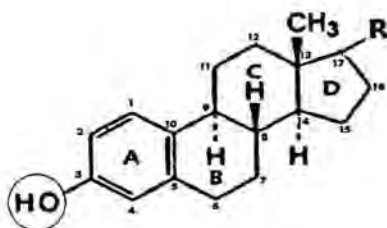


Figura 1.1: Fórmula general para los estrógenos conjugados.

Los estrógenos conjugados sintéticos están compuestos por una mezcla de 9 sustancias sintéticas estrogénicas que son: estrona sulfato sódico, equilina sulfato sódico, 17α-dihidroequilina sulfato sódico, 17α-estradiol sulfato sódico, 17β-dihidroequilina sulfato sódico, 17α-dihidroequilenina sulfato sódico, 17β-dihidroequilenina sulfato sódico, equilenina sulfato sódico y 17β-estradiol sulfato sódico.

Al ser una mezcla de compuestos estrogénicos, la potencia de cada uno es diferente. En la tabla siguiente se muestra la potencia relativa (tabla 1.1) (3).

Estrógenos conjugados	Crecimiento del útero de la rata	Supresión de la gonadotropinas
Preparación completa	100	100
Sulfato sódico de estrona	32	40
Sulfato sódico de equilina	80	200
Sulfato sódico de 17 α -dihidroequilina	3	12
Sulfato sódico equilenina	11	—
Sulfato sódico 17 β -estradiol	246	—
Sulfato sódico 17 α -estradiol	4	6
Sulfato sódico 17 β -dihidroequilina	200	—
Sulfato sódico 17 β -dihidroequilenina	9	—
Sulfato sódico 17 α -dihidroequilenina	1	—

Tabla 1.1: Diferente potencia de los componentes de los estrógenos conjugados sobre el crecimiento del útero de la rata y la supresión de las gonadotropinas (3).

Existen compuestos no esteroides que tienen actividad estrogénica débil o antiestrogénica, entre ellos flavonas, isoflavonas y derivados del coumestán, los cuales se encuentran de manera natural en diversas plantas y hongos. También varios compuestos artificiales poseen esta actividad, entre ellos plaguicidas y plastificantes. Todos ellos poseen una actividad relativamente débil pero su continuo aumento y acumulación ha empezado a causar preocupación (4).

1.2 EFECTOS FARMACOLÓGICOS

Los estrógenos tienen un papel primordial en el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor de la mujer y de sus caracteres sexuales secundarios. Aunque los estrógenos en la circulación se encuentran en un equilibrio dinámico con sus metabolitos. El 17 β -estradiol es el estrógeno intracelular más importante tanto por su mayor cantidad como por su potencia (doce veces en el caso de la estrona y ochenta veces en el caso del estriol) (5). El hidroxilo unido al carbono de la posición 3 es fundamental para la unión con el receptor estrogénico, su sustitución o pérdida disminuye de manera significativa la afinidad sobre el receptor (6).

1.2.1 Efectos sobre las glándulas endocrinas

Los estrógenos circulantes modulan a través de un "feed-back" negativo la secreción de la hormona luteizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) por parte de la pituitaria (7).

1.2.2 Efectos sobre la presión sanguínea

Los estrógenos conjugados provocan un aumento de la síntesis proteica del hígado, que conlleva un aumento del sustrato de la renina y la actividad del sistema angiotensina-aldosterona, causante de la hipertensión (8,9,10).

1.2.3 Efectos sobre la tiroides

Los estrógenos provocan una disminución de la producción y liberación de la TSH (hormona tiroidea), simultáneamente aumenta la fracción de yodo sanguíneo fijado a las proteínas (7).

1.2.4 Efectos sobre la corteza suprarrenal

Los estrógenos conjugados producen una hipertrofia de la corteza suprarrenal, sin embargo, provoca una menor síntesis de cortisol que parece ser causado por la inhibición de la síntesis de colesterol que provocan los estrógenos (7).

1.2.5 Efectos sobre el sistema reproductor

La secreción de estrógenos durante la infancia es ínfima, pero en la pubertad, la secreción aumenta 20 veces o más, lo que provoca el crecimiento de los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, la vagina y los genitales externos. Los estrógenos conjugados provocan la proliferación de tejidos glandulares y células epiteliales ciliadas en las trompas de Falopio. También transforman el epitelio vaginal de cúbico a estratificado, el cual es más resistente a traumatismos e infecciones (5).

En el sistema reproductor adulto, los estrógenos actúan sobre las trompas de Falopio regulando la motilidad peristáltica, la secreción y la apertura o cierre de la luz interna de la unión útero-tubárica. Los estrógenos provocan una aceleración del óvulo dando a lugar a que la mucosa uterina no esté preparada para anidar el óvulo por ello la administración externa de estrógenos puede tener un efecto anticonceptivo (7).

1.2.6 Efectos sobre las glándulas mamarias

Los estrógenos provocan el desarrollo de los tejidos del estroma mamario, el crecimiento del sistema de conductos y depósitos de grasa en las mamas, son las primeras fases para llegar a unas glándulas mamarias funcionales (5). Los estrógenos cuando se administran a dosis elevadas pueden llegar a producir la inhibición de forma indirecta de la lactación (11).

1.2.7 Efectos sobre el sistema cardiovascular

La existencia de receptores de los estrógenos en las células musculares se ha demostrado en varias especies de mamíferos (12,13). Existen numerosos estudios que demuestran un efecto vasodilatador de los estrógenos en animales de experimentación (mono, rata, conejo, oveja,...) fundamentalmente sobre las arterias uterinas pero se manifiesta en todo el sistema circulatorio (14,15,16). El efecto vasodilatador parece ser un fenómeno multifactorial, que abarca un aumento de la producción de prostaciclina (17), la capacidad antioxidante de los estrógenos que dificultaría la reducción del óxido nítrico, compuesto que actúa como factor relajante derivado del endotelio (18) y su efecto antagonista del calcio (19).

1.2.8 Efectos sobre los niveles de los lípidos sanguíneos

Los estrógenos conjugados provocan una disminución de los niveles de colesterol sanguíneo, un aumento de los niveles de HDL-colesterol, una disminución de los LDL-colesterol y un aumento de los VLDL-colesterol (20).

1.2.9 Efectos sobre el metabolismo

Los estrógenos aumentan ligeramente la tasa del metabolismo (5).

1.2.10 Efectos sobre la piel y mucosas

Los estrógenos son un factor trófico de la piel y aumentan los elementos elásticos de la misma (7).

1.2.11 Efectos sobre la masa esquelética

Antes del descubrimiento de la existencia de receptores estrogénicos en las células óseas (21), se atribuía exclusivamente al efecto sobre el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Los receptores estrogénicos de las células óseas controlan la producción y liberación de calcitonina, inhiben la síntesis de prostaglandinas de la serie E y disminuye en un 50% el factor de necrosis tumoral que estimula la resorción ósea. Los anteriores efectos provocan que los estrógenos aumenten la actividad osteoblástica (22). El déficit de estrógenos provoca una disminución osteoblástica del hueso, disminución de la matriz ósea y disminución del depósito de calcio y fosfato. Estos hechos pueden provocar un efecto grave que puede conllevar a la osteoporosis, que es susceptible de tratarse con la terapia de sustitución hormonal (5).

1.2.12 Efectos sobre los electrolitos

Los estrógenos provocan una ligera retención de sodio y agua en los túbulos renales (5).

1.2.13 Efectos sobre el SNC

Los estrógenos producen cambios en el estado de ánimo y la memoria y retrasan los procesos degenerativos neuronales (23).

1.2.14 Efectos sobre el sistema inmune

Los estrógenos modifican la inmunidad del organismo (24).

1.3 MECANISMO DE ACCION

Los estrógenos fundamentales actúan por medio de la regulación de la expresión de los genes. Las hormonas esteroideas debido a su lipofilia, difunde pasivamente a través de las membranas celulares y se unen a un receptor presente en el núcleo (25). Los receptores de los estrógenos se encuentran fundamentalmente en las vías reproductoras femeninas, mamas, hipófisis, hipotálamo, hueso e hígado. El receptor tiene un peso molecular de aproximadamente 66000 Da, con un único sitio de unión a hormonas. El receptor interactúa con secuencias de nucleótidos específicas denominadas elementos de reacción a estrógenos presentes en genes precondicionados, y esta interacción incrementa, o en algunas situaciones disminuye, la transcripción de genes regulados por hormonas. Los estrógenos también tienen un mecanismo de acción no genómico, siendo una respuesta más rápida mediada por la activación de los canales de calcio (26).

1.4 FARMACOCINETICA

1.4.1 Absorción

Los estrógenos conjugados se absorben bien a través del tracto gastrointestinal (27), lo hacen rápidamente y por completo. También se absorben bien por vía vaginal y a través de la piel y mucosas (28). La absorción después de la administración vaginal es más rápida que la administración oral.

La administración de estrógenos conjugados producen unos niveles plasmáticos más sostenidos que la administración de estrona o 17β -estradiol libre. Una dosis oral de

0.625 mg de estrógenos conjugados consigue concentraciones de estradiol y estrona de 40 pg/ml y 150 pg/ml, respectivamente (29). Pero no siempre la acción farmacológica de los estrógenos depende de las concentraciones séricas como es el caso del tratamiento de los trastornos vasomotores de la menopausia que no guardan relación con los niveles plasmáticos (30).

1.4.2 Distribución

La distribución de los estrógenos exógenos es similar a la de los estrógenos endógenos. Los estrógenos son ampliamente distribuidos en el cuerpo y se encuentran generalmente a altas concentraciones en los órganos sexuales diana debido a una afinidad específica. Los estrógenos conjugados al ser hidrosolubles no tienen tendencia para atravesar con facilidad la membrana celular por lo que tendrán que liberarse de su éster sulfúrico. Los estrógenos conjugados tienen una fuerte unión a la albúmina mientras que la unión de los estrógenos endógenos es escasa y por lo tanto tienen mayor capacidad de unión al receptor estrogénico (31,32). El 17 β -estradiol está unido generalmente a una globulina (SHBG globulina de unión a hormonas sexuales) y en menor grado a la albúmina. Los estrógenos conjugados se unen principalmente a albúmina mientras que los estrógenos no conjugados se unen a la albúmina y la SHBG. En la tabla 1.2 se muestra la afinidad, el porcentaje de unión a SHBG y porcentaje de unión a albúmina para cada uno de los estrógenos conjugados.

Estrógeno	Afinidad relativa receptor estrogénico	% unión SHBG	% unión albúmina
17- β -Estradiol	100	32	0
Estrona	11	16	80
Estríol	10	1	91
Equilina	40	26	13
Equilenina	7	---	---
17 β -dihidroequilina	47	---	---
17 β -dihidroequilenina	46	---	---
17 α -estradiol	32	---	---
17 α -dihidroequilina	31	---	---
17 α -dihidroequilenina	18	---	---
Sulfato de estrona	2	---	99

Tabla 1.2: Valores de afinidad relativa al receptor estrogénico, el porcentaje de unión a SHBG y porcentaje de unión a albúmina para cada uno de los estrógenos conjugados.

1.4.3 Metabolismo y excreción

Los estrógenos exógenos se metabolizan de la misma manera que los endógenos (33). Los estrógenos circulantes se encuentran en un equilibrio dinámico con sus metabolitos. Estas transformaciones tienen lugar en el hígado. El 17 β -estradiol se

convierte reversiblemente a estrona, y ambos se convierten en estríol por hidroxilación del carbono 16 del anillo D. Cuando la estrona sufre una hidroxilación en la posición 2 ó 4 del anillo A, se forma como metabolito principal la 2,4-hidroxiestrona y sus isómeros, este cambio es irreversible. Después de la hidroxilación del anillo A o D los estrógenos sufren conjugación con sulfato o glucurónidos en el hígado, los conjugados son solubles y pueden ser excretados por el riñón, los metabolitos urinarios principales son el estríol y la hidroxiestrona conjugadas (34). La secreción a través de la bilis de los conjugados en el intestino da lugar a una recirculación enterohepática (35). Cuando se administran estrógenos conjugados, el sulfato de estrona administrado actúa como fuente de estrona y 17 β -estradiol. La equilina y equilenina tienen estructuras químicas muy similares a las del 17 β -estradiol y estrona, y por lo tanto ejercen una influencia considerable sobre los receptores estrogénicos.

El hígado conjugua los estrógenos para formar glucurónidos y sulfatos, aproximadamente la 1/5 parte de estos productos conjugados se excreta por la bilis, mientras la otra parte por la orina (5).

1.4.3.1 Niveles plasmáticos

La concentración plasmática máxima de sulfato de equilina se alcanza a las 4 horas, mientras que las concentraciones máximas de equilina y estrona se producen entre las 4 y 8 horas después de la administración oral de estrógenos conjugados (36). Dosis elevadas de estrógenos conjugados (10 mg) administrados por vía oral dan lugar a concentraciones plasmáticas máximas de 560 pg/ml de equilina y de 1400 pg/ml de estrona, a las 3 y 6 horas respectivamente. A las 24 horas las concentraciones disminuyen hasta 125 pg/ml y 280 pg/ml respectivamente (37).

La semivida del sulfato de equilina corresponde a 290 min, de 8 a 10 veces superior a la equilina (19-27 min). Estos compuestos estrogénicos pueden permanecer en niveles apreciables meses después de haberse suspendido el tratamiento con una dosis 1.25 mg de estrógenos conjugados (38).

1.5 INTERACCIONES

Se ha descrito disminución de la acción estrogénica con la administración de fármacos inductores de los enzimas hepáticos (carbamazepina, fenobarbital, fenitoina, rifampicina,...) debido a una aceleración del metabolismo estrogénico.

Los estrógenos pueden antagonizar los efectos de los anticoagulantes orales obligando a incrementar la dosis de éstos (39).

El tratamiento con estrógenos puede interferir con las siguientes pruebas de laboratorio (39):

- Aumento de la protrombina y de los factores de coagulación VII, VIII, IX y X
- Descenso de la antitrombina III.
- Aumento de la globulina de unión a la hormona tiroidea, dando niveles elevados de la misma. Los valores de t_4 libre permanecen inalterados.
- Alteraciones de la prueba de tolerancia a la glucosa
- Disminución de la prueba de la metirapona
- Disminución de los niveles de piridoxina y de folatos.

1.6 INDICACIONES Y USO

1.6.1 Bases del tratamiento sustitutivo con estrógenos:

La principal fuente de estrógenos durante el ciclo normal de la mujer adulta es el folículo ovárico, el cual secreta entre 60 a 600 microgramos de 17β -estradiol diarios y da lugar a unos niveles plasmáticos de 40 a 400 picogramos/ml dependiendo de la fase del ciclo menstrual, mientras que durante el embarazo la placenta es la principal fuente de estrógenos. Los estrógenos se sintetizan en los ovarios a partir del colesterol sanguíneo y en pequeña medida a partir del acetyl-coenzima A. Después en el climaterio, el estrógeno intracelular más importante es la estrona que se produce por la interconversión de la androstenediona en los tejidos periféricos. De este modo la estrona y su forma conjugada, estrona sulfato, son los estrógenos más importantes en la mujer posmenopáusica, los cuales tienen una potencia menor que el 17β -estradiol y esta disminución de actividad estrogénica conlleva los síntomas y complicaciones que pueden ocurrir en estados de déficit de actividad estrogénica de origen natural o quirúrgico.

Durante el climaterio, la función ovárica disminuye hasta que se detiene finalmente, ello se manifiesta con la aparición de múltiples síntomas y cambios. La base para la utilización terapéutica de los estrógenos es el mantenimiento del nivel de estrógenos en el organismo y tratar de prevenir los efectos derivados de una deficiencia estrogénica. Los estrógenos conjugados están indicados generalmente para el tratamiento de los desordenes relacionados con la insuficiencia estrogénica, tales como:

- Trastornos vasomotores de moderados a severos asociados con la menopausia.
- Prevención y tratamiento de la pérdida de masa ósea.
- Vaginitis y uretritis atrofica.
- Ovariectomía o insuficiencia ovárica primaria.

1.6.2 Tratamiento de los síntomas vasomotores con estrógenos

Alrededor del 75-85% de las mujeres posmenopáusicas presentan síntomas vasomotores (40), los cuales pueden persistir más de 5 años e incluso más tiempo (41,42). La duración de los efectos vasomotores es variable, entre pocos segundos y una hora; así mismo también varía la frecuencia desde dos a tres veces al día como varios en una hora. Los trastornos más característicos son los sofocos con sudoración profusa que se acompaña frecuentemente de escalofríos y alteraciones psicosomáticas, tales como irritabilidad, ansiedad, pánico, depresión, cansancio, dolor articular y muscular, cefaleas y trastornos del sueño (43).

El tratamiento consigue disminuir la intensidad de los síntomas y la frecuencia de los sofocos aproximadamente en un 80% (44). Sin embargo la dosis de estrógenos que controlan satisfactoriamente los sofocos puede ser alta (45).

1.6.3 Tratamiento de la atrofia urogenital

Los estados de deficiencia estrogénica conducen a una atrofia de la vagina, con disminución del grosor de la pared vaginal y atrofia de las glándulas vaginales. Los síntomas de la atrofia vaginal comprenden dispareunia, sequedad vaginal, picor e irritación. Estos trastornos se pueden tratar con administración local de estrógenos en forma de pomada vaginal (41,42).

En situación de deficiencia estrogénica, los cambios que sufre el tracto genitourinario provocan estados de incontinencia (frecuencia y urgencia), atrofia de la vejiga, disminución de la mucosa uretral y aumento del pH vaginal que da lugar a una mayor incidencia de infecciones bacterianas (45). El tratamiento con estrógeno por vía vaginal reduce en un 50% las infecciones recurrentes del tracto urinario (45).

1.6.4 Tratamiento de la osteoporosis

La osteoporosis es un desorden relacionado con la edad caracterizado por una pérdida de la masa esquelética que aumenta la vulnerabilidad de los huesos frente las fracturas. Cuando las mujeres cesan de producir estrógenos hay una pérdida inmediata del calcio del hueso; se estima que es de un 3-5% en los 3 primeros años y 1-3% anual durante el resto de la vida (46). Cuando la pérdida de calcio es superior al 25 % de la masa ósea, las mujeres están sujetas a una incidencia superior en fracturas de cadera, muñeca, etc. Existen varios estudios que indican que la administración de los estrógenos conjugados posee efectos beneficiosos sobre la masa esquelética de las mujeres posmenopáusicas (47,48,49) debido a la mejora de la absorción de calcio por parte del intestino, a los procesos de reabsorción ósea y a la inhibición de la pérdida de calcio a través del riñón.

Los ensayos clínicos han demostrado que la terapia con estrógenos conjugados si se instaure rápidamente al inicio de la menopausia previene la pérdida ósea de la etapa inicial y disminuye en un 50% la incidencia de fracturas (50,51). Los estrógenos previenen las fracturas vertebrales y femorales (50,51,52,53,54).

El tratamiento con estrógenos conlleva un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y endometrio conjuntamente con los problemas cardiovasculares de embolismos, por ello se considera como un tratamiento de segunda línea (55).

1.7 ADMINISTRACION Y DOSIFICACION

Los estrógenos conjugados introducidos en clínica hace más de 50 años siguen teniendo una importancia en el tratamiento hormonal sustitutivo. Se dispone de una gran experiencia clínica que avala su eficacia y tolerabilidad en el tratamiento de los síntomas vasomotores y atrofia urogenital, característicos de la menopausia, la prevención de la osteoporosis y la enfermedad cardiovascular en la menopausia.

Los estrógenos conjugados se utilizan en la terapia de sustitución a la dosis diaria de 0.625-1.25 mg por vía oral, ya que estas dosis provocan niveles de estradiol y estrona registradas en el ciclo menstrual normal (56).

1.7.1 Dosificación

La dosificación de los estrógenos conjugados varía según la indicación clínica:

- Síntomas vasomotores. Para el tratamiento de los síntomas moderados a severos, se debe elegir la menor dosis que pueda controlar los síntomas y durante el menor tiempo posible (57). La dosis usual es de 0.625 a 1.25 mg diarios. Debe ser una administración cíclica.
- Vaginitis y uretritis atrófica. Para el tratamiento se recomienda una dosis de 0.3 a 1.25 mg diarios, dependiendo de la respuesta individual de cada paciente. Se administra cíclicamente.
- Osteoporosis posmenopáusica: Para el tratamiento se recomienda una dosis de 0.625 mg diarios que debe ser una administración cíclica (tres semanas de tratamiento y una de descanso). La administración conjunta con suplementos de calcio puede reducir a la mitad, la dosis de estrógenos sin disminuir la efectividad (58).
- Ovariectomía o insuficiencia ovárica primaria. Para el tratamiento se deberá ajustar según la gravedad de los síntomas y la dosis de mantenimiento debe ser la más baja posible que controle efectivamente los síntomas. La dosis recomendada es de 1.25 mg diarios administrados de forma cíclica.

1.8 EFECTOS ADVERSOS

En general, la tolerancia de los estrógenos conjugados es buena debido a la baja dosis correspondiente a la terapia de sustitución en la que se administra y su naturaleza endógena. Se han descrito casos de cefalea, migraña, reacciones de hipersensibilidad, alteraciones de la función hepática, ictericia y depresión. Los estrógenos a dosis elevadas se han asociado a trastornos de la vesícula biliar, hipercalcemia y aumento de complicaciones tromboembólicas. Por su acción sobre el balance mineral e hídrico los estrógenos provocan un aumento de peso y son frecuentes los edemas que remite al disminuir la dosis.

El tratamiento con estrógenos conjugados en mujeres posmenopáusicas aumenta en un 30% el riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares de tipo isquémicos así como la gravedad (59,60). La combinación de estrógenos conjugados conjuntamente con progestágenos aumenta el riesgo de padecer trombosis venosa profunda (61), enfermedades coronarias (62) y pulmonar (63). El riesgo de padecer problemas trombóticos es mayor durante el primer año de tratamiento (64).

1.9 TERATOGENICIDAD

Los estrógenos atraviesan la placenta, por tanto están contraindicados totalmente durante el embarazo. Los fetos femeninos expuestos a dietilestilbestrol durante el embarazo, posteriormente tienen un incremento del riesgo de padecer cáncer vaginal o cervical (65,66), adenosis vaginal, cambios en el epitelio de la vagina y cérvix (67). Para los estrógenos conjugados no se ha descrito tal efecto. También existen evidencias de defectos congénitos en el corazón y defectos en la reducción límbica en los fetos expuestos a estrógenos.

1.10 CANCEROGENESIS

1.10.1 Cáncer de endometrio

Durante varias décadas se han administrado estrógenos a mujeres posmenopáusicas para mejorar los síntomas vasomotores y psicológicos pero el tratamiento con estrógenos conjugados siempre ha tenido un factor negativo que es el aumento de riesgo de padecer cáncer de endometrio (68,69,70). La hiperplasia endometrial se presenta entre 6 a 12% de las pacientes después de 12 meses de tratamiento con estrógenos solos y de 10 a 56% después de 24 meses (71). El riesgo depende de la dosis y el tiempo de exposición, en el caso de tratamientos inferiores a 5 años se considera que el aumento del riesgo es inferior a los beneficios. Sin embargo, este aumento puede disminuirse con la administración concomitante de progestágenos (45,72,73,74,75,76). La protección de los progestágenos se cree que es debido al sangrado vaginal mensual que provoca (75,77).

1.10.2 Cáncer de mama

El uso combinado de estrógenos y progestágenos de forma cíclica o continua durante un plazo relativamente corto incrementa los cánceres de mama incidentes y dificultan su diagnóstico (76,78,79).

Se ha observado que existe una relación entre la constitución de la mujer posmenopáusica y el riesgo de padecer cáncer de mama. La mujer posmenopáusica delgada, definida como aquellas con un índice de la masa corporal (Body Mass Index) inferior a 25, el riesgo relativo de padecer cáncer de mama disminuye en relación con la menopausia. Este efecto protector de la menopausia no se encuentra en mujeres con BMI superior a 25. Durante el tratamiento con estrógenos las mujeres delgadas (BMI < 25) el riesgo de padecer cáncer de mama aumenta un 10% respecto a la mujer delgada no tratada (45).

1.11 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Los estrógenos conjugados se pueden administrar por vía oral (0.3-2.5 mg) en forma de comprimidos, por vía intravenosa (5mg/ml) y por vía tópica en forma de crema vaginal (0.675 mg/g).

1.12 CONTRAINDICACIONES Y RECOMENDACIONES

Durante el tratamiento de estrógenos conjugados se recomienda un examen exploratorio pélvico, mamas, control de la presión sanguínea, citología vaginal, control del perfil lipídico y de la glucemia. Se recomienda ajustar la dosis de acuerdo a la sintomatología.

Las contraindicaciones de la terapia hormonal de reemplazo se pueden clasificar en contraindicaciones absolutas que impiden el tratamiento y contraindicaciones relativas que necesitan de una especial atención médica. Las contraindicaciones absolutas son (38,79): Neoplasia estrógeno dependiente actual (mama y endometrio), sangrado uterino de causa desconocida, trombosis vascular reciente, insuficiencia hepática aguda, ictericia colestásica, neoplasia hepática, síndrome Rotor, enfermedad vascular cerebral hemorrágica o trombótica, embarazo y lactancia.

Las contraindicaciones relativas que requieren un control médico son (80,81): antecedentes de neoplasia estrogénico-dependiente, endometriosis, tromboflebitis, enfermedad vascular cerebral, enfermedad pancreática, enfermedad hepática crónica, miomatosis uterina, enfermedad vascular periférica, enfermedad vesícula biliar, mastopatía fibroquística, hiperlipidemia e hipertensión, infarto miocardio, migraña, porfiria, diabetes mellitus, epilepsia y leiomiomata.

1.13 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FISICOQUÍMICAS

1.13.1 Nomenclatura

Los estrógenos conjugados son una mezcla de diversas formas de estrógenos conjugados obtenidos de la orina de yeguas preñadas o por síntesis, dispersados en un diluyente en polvo adecuado.

Los dos componentes principales son el sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo y sodio (sulfato de estrona y sodio), sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ilo y sodio (sulfato de equilina y sodio). Los compuestos concomitantes son el sulfato de 17 α -estradiol y sodio, sulfato de 17 α -dihidroequilina y sodio y sulfato de 17 β -dihidroequilina y sodio. Las impurezas descritas son el sulfato de equilenina y sodio, sulfato de 17 α -dihidroequilenina y sodio, sulfato de 17 β -dihidroequilenina y sodio y el sulfato de 17 β -estradiol y sodio.

1.13.2 Descripción

1.13.2.1 Forma física

Los estrógenos conjugados son un polvo amorfo de color desde casi blanco a parduzco.

1.13.2.2 Forma estructural

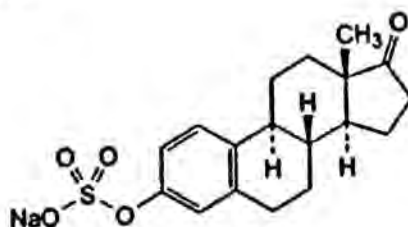


Figura 1.2: Sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo y sodio (sulfato de estrona y sodio).
 $C_{18}H_{21}O_5NaS$, Peso molecular: 372.4.

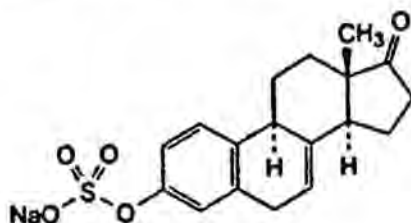


Figura 1.3: Sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ilo y sodio (sulfato de equilina y sodio). $C_{18}H_{19}O_5NaS$, Peso molecular: 370.4

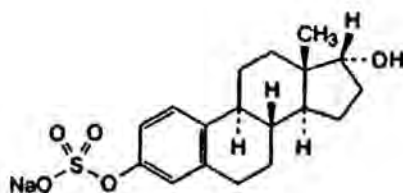


Figura 1.4: Sulfato de 17α-hidroxiestra-1,3,5(1)-trien-3-ilo y sodio (sulfato de 17α-estradiol y sodio). $C_{18}H_{23}O_5NaS$, Peso molecular: 374.4

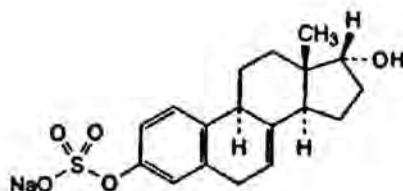


Figura 1.5: Sulfato de 17α-hidroxiestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ilo y sodio (sulfato de 17α-dihidroequilina y sodio). $C_{18}H_{21}O_5NaS$, Peso molecular: 372.4

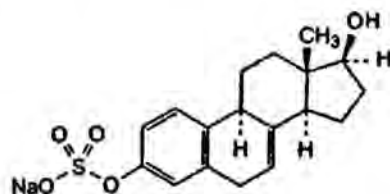


Figura 1.6: Sulfato de 17β-hidroxiestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ilo y sodio (sulfato de 17β-dihidroequilina y sodio). $C_{18}H_{21}O_5NaS$, Peso molecular: 372.4

1.13.3 Solubilidad

La solubilidad de los estrógenos conjugados depende de la naturaleza de las sustancias en las cuales se diluyen.

1.13.4 Perfil de Impurezas

Las impurezas descritas tanto en la Real Farmacopea Española 3^{era} Ed. (82) como en la Farmacopea Europea 5^aEd. (83) son las siguientes:

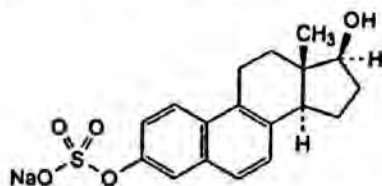


Figura 1.7: Sulfato de 17β-oxoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-3-ilo y sodio (Sulfato de 17β-dihidroequilenina y sodio). $C_{18}H_{19}O_5NaS$

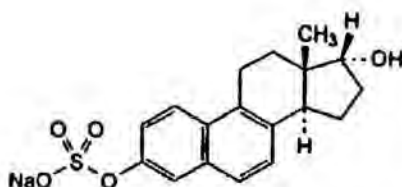


Figura 1.8: Sulfato de 17α-oxoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-3-ilo y sodio (Sulfato de 17α-dihidroequilenina y sodio). $C_{18}H_{19}O_5NaS$

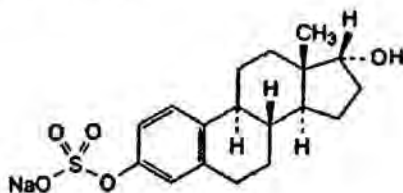


Figura 1.9: Sulfato de 17β-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo y sodio (Sulfato de 17β-estradiol y sodio). $C_{18}H_{23}O_5NaS$

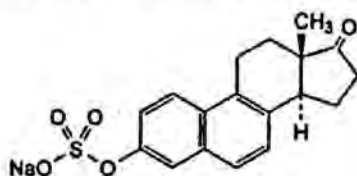


Figura 1.10: Sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10),6,8-pentaen-3-ilo y sodio (sulfato de equilenina y sodio). $C_{18}H_{17}O_5NaS$

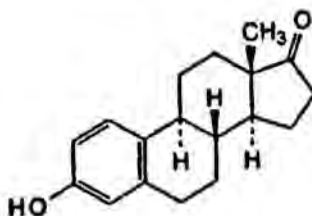


Figura 1.11: 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (Estrona). $C_{18}H_{22}O_2$

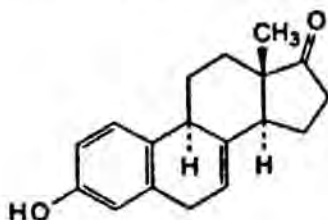


Figura 1.12: 3-hidroxiestra-1,3,5(10),7-tetra-en-17-ona (Equilina). $C_{18}H_{20}O_2$

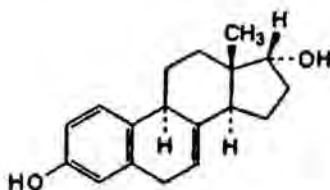


Figura 1.13: Estra-1,3,5(10),7-tetraen-3,17α-diol (17α-dihidroequilina). $C_{18}H_{22}O_2$

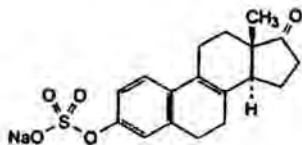


Figura 1.14: Sulfato de 17-oxoestra-1,3,5,(10),6,8-tetraen-3-ilo y sodio (Sulfato de $\Delta 8,9$ -deshidroestróna). $C_{18}H_{19}O_5NaS$

1.13.5 Conservación

La principal recomendación que indican las diferentes monografías es que se debe conservar en envases herméticos y especifican que no deben ser congelados.

CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIBLIOGRAFICO DE LA FORMA FARMACÉUTICA

2.1 INTRODUCCIÓN

Un medicamento debe ser eficaz, seguro y estable. La buena eficacia de un medicamento consiste en conseguir que con una cantidad mínima de principio activo sea posible alcanzar los efectos terapéuticos deseados y al ser la cantidad mínima de principio activo, la seguridad del medicamento se ve favorecida al disminuir los efectos secundarios indeseados y la posible toxicidad del medicamento. La seguridad del medicamento es ampliamente estudiada tanto en su fase inicial de estudio del principio activo como una vez comercializado a través de la farmacovigilancia. Los estudios de estabilidad del medicamento ya se inician en los estudios de preformulación y se completa con los estudios de envejecimiento acelerado y con los estudios de estabilidad a tiempo real durante el plazo de validez del medicamento.

En algunos casos para conseguir un medicamento eficaz, es necesario que la liberación sea intensa y en un corto periodo de tiempo que es el caso de las formas farmacéuticas convencionales, mientras en otros casos es necesario mantener en el tiempo unos niveles plasmáticos adecuados. El principio activo puede llegar a una concentración adecuada al lugar de acción pero esta concentración no se mantenga

en el tiempo suficiente, en este caso la administración de formas farmacéuticas convencionales necesita de la administración de dosis repetidas en un periodo de tiempo concreto. El cumplimiento de una terapia que conlleva la administración continuada durante un largo periodo de tiempo, es fácil que acabe en un incumplimiento de la pauta de dosificación por parte del paciente y se produzca un fallo de la eficacia de la terapia. Ante este problema terapéutico, a partir de los años 70 se empezó a realizar modificaciones tecnológicas en las formas farmacéuticas convencionales para conseguir alargar el tiempo de liberación del principio activo, dando a lugar a la aparición de las formas farmacéuticas de liberación modificada.

El término de forma farmacéutica de liberación modificada es muy confuso y amplio. Se pueden diferenciar las siguientes categorías:

1.- Liberación diferida (término usado por la FDA y USP). Es aquella en la que el principio activo se libera en determinados tiempos o zonas a partir de unidades de liberación inmediata, que están englobados en una única forma de dosificación (ejemplo cápsula con microgránulos recubiertos que liberan a diferente tiempo o en diferentes zonas del aparato digestivo) (figura 2.1).

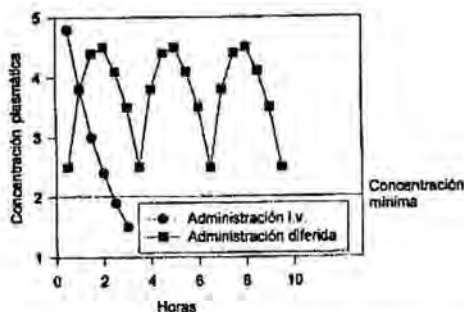


Figura 2.1: Representación gráfica de los niveles plasmáticos de una liberación diferida frente a una administración intravenosa (84).

2.- Liberación prolongada (FDA) o extendida (USP). Se puede encontrar 2 modalidades de formas farmacéuticas: el proceso de liberación se hace de forma más lenta que las formas farmacéuticas convencionales, en otros la liberación se modula de tal forma que los niveles plasmáticos terapéuticos se mantienen en el tiempo. En el último caso se denomina forma farmacéutica de liberación controlada (figura 2.2). Muchos autores consideran los sistemas de liberación controlada como aquellos en los

que se consigue una mayor duración de los niveles plasmáticos eficaces y una liberación del principio activo perfectamente definida y reproducible.

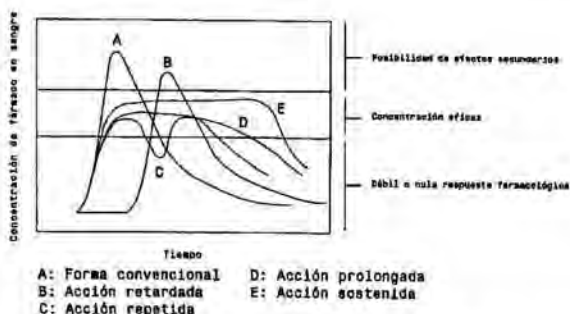


Figura 2.2: Representación de los niveles plasmáticos según el tipo de formulación (85).

Los principios activos de carácter peptídico o proteico, así como de aquellos que presentan una farmacocinética o farmacodinámica sujeta a ritmos circadianos, la optimización terapéutica conlleva conseguir una liberación pulsátil, la cual se puede definir como la capacidad que posee un sistema para liberar un principio activo a velocidades muy grandes o muy pequeñas durante un intervalo de tiempo deseable.

Con las formas farmacéuticas convencionales no se consigue tener un adecuado control del efecto farmacológico, ya que las concentraciones plasmáticas terapéuticas se consiguen con administraciones intermitentes y dan lugar a unas concentraciones muy variables e impredecibles, las cuales se sitúan frecuentemente en valores subterapéuticos o supratrapéuticos. Mientras que con las formas farmacéuticas de liberación controlada, los niveles plasmáticos son más constantes y predecibles (86).

En la liberación intervienen proceso de difusión pero los mecanismos pueden ser múltiples, por ello se puede clasificar:

a).-Sistemas monolíticos o matriciales. En estos sistemas el principio activo está uniformemente distribuido en el seno de un polímero, ya sea en forma de solución o suspensión. Pueden ser homogéneos cuando son sistemas matriciales constituidos por una fase continua no porosa o ser heterogéneo cuando la difusión del principio activo se realiza a través de unos poros.

b).-Sistemas de reservorio. Están constituidos por un reservorio del principio activo rodeado por una membrana polimérica que regula el proceso de difusión.

c).-Sistemas activados por disolvente.

- Osmóticos. La liberación del principio activo viene controlada por la presión osmótica. Están constituidos por un núcleo con 2 capas: principio activo y agente osmótico que se hincha en contacto con el agua y empuja hacia el exterior al principio activo.
- Hidratación polimérica: La liberación del principio activo está modulada por la hidratación de un polímero.

d).- Sistemas controlados químicamente. La liberación del principio activo está controlado bien por una reacción química hidrolítica o enzimática, que rompe uniones lábiles de un polímero o bien por una ionización o protonización.

2.2 SISTEMAS ORALES DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Se pueden clasificar según el proceso implicado en la liberación del principio activo.

2.2.1 Sistema con liberación continua del principio activo.

2.2.1.1 Sistemas osmóticos

El sistema "oros" es el más conocido; está constituido por un núcleo osmótico que contiene el principio activo, agentes osmóticos (NaCl, KCl, manitol,...) y excipientes de compresión. El núcleo está rodeado por una membrana polimérica que permite el paso de agua y posee un orificio (87). Una vez que penetra el agua el principio activo sale por el orificio (figura 2.3).

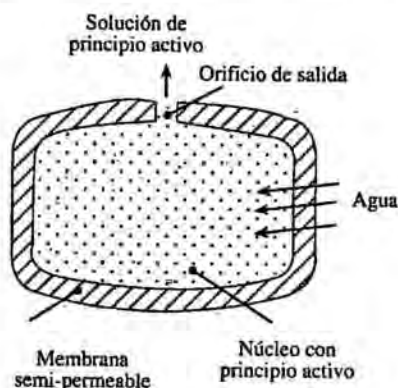


Figura 2.3: Corte transversal de un sistema osmótico simple "Oros" (88).

Los factores primordiales que controla la liberación del principio activo son:

- a).- Solubilidad del principio activo. Si el principio activo es poco soluble, la presión osmótica es insuficiente y si la solubilidad es alta, la fase de liberación a velocidad constante se mantiene poco tiempo.
- b).- Naturaleza de la membrana. Según la membrana el disolvente puede entrar con más o menos facilidad.
- c).- Diámetro del orificio. Dependiendo de la solubilidad del principio activo y de la naturaleza de los otros componentes, existe un intervalo para el tamaño del orificio para conseguir una velocidad constante.

El sistema "oros" para principios activos muy solubles o poco solubles no es aplicable. Para estos principios activos se utiliza el sistema osmótico llamado "Oros push-pull".

El sistema osmótico "oros push-pull" consiste en una variación del sistema "oros" sencillo. Consiste en un "oros" en el cual el núcleo osmótico está separado por una membrana flexible (89). Cuando entra el agua, el principio activo se disuelve o se dispersa, mientras que en el compartimiento inferior se crea una presión osmótica que empuja a la membrana flexible que provoca la salida del principio activo al exterior por el orificio de la membrana exterior (figura 2.4).

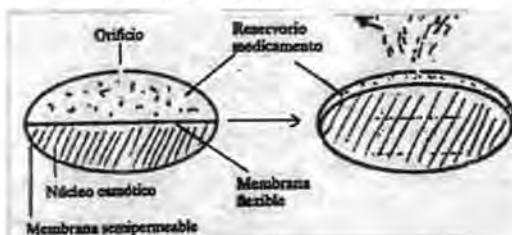


Figura 2.4: Corte trasversal de un sistema osmótico bicompartimental ("Oros Push-Pull").

2.2.1.2 Sistemas con membrana microporosa

Consiste en un núcleo rodeado por una membrana polimérica que posee pequeñas cantidades de sustancias formadoras de poros (LSS, benzoato sódico,...), al disolverse crean poros por los que se libera el principio activo. Según la cantidad de agente formador de poros, se puede conseguir una regulación de la liberación del principio activo.

2.2.1.3 Formulaciones pH dependientes

El valor del pH del tracto gastrointestinal varía y este tipo de formulaciones pueden ser una alternativa interesante. Consiste en un núcleo con principio activo mezclado con agentes reguladores del pH con una cubierta semipermeable. Cuando penetra el fluido los agentes reguladores de pH dan lugar a un pH adecuado para disolver el principio activo, el cual difunde a través de la membrana polimérica a velocidad constante.

2.2.1.4 Matrices hidrofílicas

En la formulación de estas formas farmacéuticas se utilizan como excipientes bases poliméricas hidrofílicas con alta capacidad gelificante. Al contacto con el agua se produce una rápida hidratación de los polímeros de la superficie del comprimido seguida de la formación de un lecho viscoso. La velocidad de la entrada de agua depende de la naturaleza del polímero. A medida que penetra el agua, el lecho incrementa su grosor y las capas externas, ya completamente hidratadas, se van erosionando y dispersando permitiendo que la hidratación se extienda en la totalidad del comprimido. La liberación del principio activo se produce por dos procesos: erosión de las capas externas de menor consistencia y la disolución del principio activo en el medio líquido que difunde a través del lecho viscoso.

El predominio de un proceso u otro depende de la solubilidad del principio activo. Si el principio activo es poco soluble, el proceso de liberación que predomina es el proceso de erosión dando lugar a una cinética de orden cero. Si el principio activo es soluble, predomina el proceso de disolución. En este caso el proceso consta de 3 etapas:

- En la fase inicial se disuelve el principio activo que está en la superficie. El agua penetra dentro de la matriz y empieza el proceso de gelificación del polímero.
- Es la fase que ocupa la mayor parte del tiempo del proceso (60-70%), durante la cual el agua penetra en el interior del sistema y se produce la expansión del gel. La liberación del principio ocurre por difusión del principio activo disuelto.
- Es el periodo final en el cual el agua penetra hasta el centro del sistema. En esta etapa, la concentración del principio activo está por debajo de su solubilidad y la velocidad de liberación va disminuyendo gradualmente.

Los polímeros que habitualmente se utilizan para la elaboración de matrices hidrofílicas son:

- Polímeros matriciales de origen natural o semisintéticos (agar-agar, alginatos, chitanos y almidones modificados).
- Ésteres de celulosa. Son derivados de la celulosa sustituida por grupos metilo, hidroxietilo, hidroxipropilo o carboximetilo. Que se diferencian por el número de sustituciones y el tipo dándole una viscosidad diferente que es un aspecto de gran importancia para su aplicación farmacéutica.
- Polímeros del ácido acrílico. Se encuentran englobados en el grupo del carbómero (Carbopol®) y se diferencian en la capacidad viscosizante y peso molecular.

2.2.1.5 Matrices lipídicas

En estos sistemas se utilizan excipientes de naturaleza grasa o lipídica que en contacto con los fluidos orgánicos sufren una gradual erosión que provoca la liberación gradual del principio activo. En general presentan problemas de estabilidad dado que las grasas naturales y sustancias lipídicas sufren con el tiempo transformaciones que dan lugar a una disminución de la velocidad de cesión del principio activo.

El proceso de liberación del principio activo puede estar controlado por mecanismos de difusión o erosión. Prevalece uno u otro dependiendo de las características del principio activo y de la naturaleza del excipiente lipídico. La liberación del principio activo es difícil de controlar debido a que depende de variaciones de pH y el contenido enzimático del tracto gastrointestinal para solventar este problema se pueden formular las matrices con una lipasa y reguladores del pH.

Las formulaciones exclusivamente a base de una matriz lipofila dan lugar a una liberación demasiado lenta e incompleta. Para mejorar la liberación es frecuente la inclusión en la formulación de tensioactivos o polímeros hidrofílicos que promueven la penetración del agua y posterior erosión de la matriz.

Recientemente se han introducido unos excipientes grasos que se agrupan en el grupo de los gelucires: consisten en derivados de grasas y aceites naturales hidrogenados, que están constituidos por mezclas definidas de monoésteres, diésteres o triésteres

del glicerol y monoésteres y diésteres de polietilenglicoles. Estos excipientes tienen un punto de fusión específico y un determinado valor de HLB (balance hidrófilo-lipófilo) que permite conseguir un control adecuado de la liberación del principio activo. Dependiendo del punto de fusión y HLB del excipiente se puede influir en la liberación del principio activo. Los excipientes con un punto de fusión más bajo y un HLB alto darán una liberación del principio activo más rápido.

2.2.1.6 Resinas cambiadores de iones

El proceso de liberación del principio activo está controlado por la fuerza iónica existente en el tracto gastrointestinal, que se puede considerar más constante que el pH. Las resinas intercambiadoras de iones son excipientes insolubles que contienen grupos aniónicos o catiónicos en la cadena polimérica de la resina. La resina aniónica o catiónica al ponerse en contacto con una solución de principio activo, el catión o anión de la resina es sustituido por el principio activo ionizado. Posteriormente en el tracto gastrointestinal, el principio activo ionizado es sustituido por los aniones o cationes del medio.

El proceso de liberación está influenciado por una serie de factores, de los cuales se pueden destacar:

- Grado de reticulación de la resina. Un aumento de la reticulación de la resina retrasa la velocidad de liberación del principio activo a consecuencia de un impedimento estérico.
- Tamaño de partícula de la resina. Un tamaño de partícula pequeño da lugar a una elevada superficie para el intercambio iónico.
- Fuerza iónica del medio. Cuando mayor concentración iónica exista en el medio mayor será la velocidad de liberación del principio activo. La liberación del principio activo puede ser diferente según el tipo de iones que existan en el medio.

Una combinación de las resinas intercambiadoras de iones y el recubrimiento con polímeros insolubles da lugar a un control mayor de la liberación al combinarse el control del intercambio iónico con el control por difusión a través de la membrana. Basado en este sistema se ha desarrollado un sistema registrado denominado Penkinetic®.

2.2.2 Sistemas con tránsito gastrointestinal retardado y liberación continua

Consisten en sistemas diseñados con la finalidad que la liberación del principio activo se vea influenciada en menor grado que los sistemas convencionales por la motilidad gastrointestinal. Estos sistemas se formulan para conseguir que aumente su permanencia en el tracto gastrointestinal, mediante un retraso de su vaciado gástrico que es el caso de los sistemas flotantes, o bien, conseguir que se adhieran a las paredes del tracto gastrointestinal que es el caso de los sistemas bioadhesivos (90).

Los sistemas flotantes pueden conseguir el retraso de su vaciado gástrico mediante sistemas basados en una cámara de flotación, con polímeros y combinaciones de ambos.

Como sistemas basados en polímeros se encuentran las cápsulas HB (Hydrodynamically Balanced Capsule) o comprimidos que poseen en su formulación un polímero (metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.) que en contacto con el fluido gástrico forman una barrera gelificada aumentando el volumen del sistema y retardando su vaciado gástrico.

Otro dispositivo de este grupo consiste en un reservorio recubierto de una membrana microporosa que en una de las caras contiene una cámara de aire que actúa de cámara de flotación consiguiendo así la flotación del sistema.

Otra variante se basa en los dispositivos de paredes laterales impermeables, tapadas con comprimidos de tipo matriz hidrófila que en contacto con un líquido, dejan un espacio vacío intermedio que actúa como cámara de flotación.

Como dispositivos de tipo efervescente se encuentra un dispositivo que consisten en una forma esférica en cuyo centro está el principio activo rodeado de materiales que son capaces de producir efervescencia en presencia de agua y todo el conjunto está rodeado por una membrana elástica y flexible. El anhídrido carbónico producido hincha el sistema y permite que flote.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3: ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL PRINCIPIO ACTIVO

3.1 INTRODUCCIÓN

La caracterización experimental de la materia prima se realiza en base a las especificaciones de la monografía de Estrógenos conjugados de la Real Farmacopea Española 3^{era} edición (82), Farmacopea Europea 5^a edición (83), además de algún ensayo descrito en el DMF de la materia prima y de algún ensayo propio realizado en el laboratorio con el fin de obtener la máxima información posible.

3.2 DEFINICIÓN

Según la definición de la Real Farmacopea Española (82) los estrógenos conjugados son una mezcla de diversas formas de estrógenos conjugados obtenidos de la orina de yeguas preñadas o por síntesis, dispersados en un diluyente en polvo adecuado. Los dos componentes principales son el sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo y sodio (sulfato de estrona y sodio) y sulfato de 17-oxoestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ilo y sodio (sulfato de equilina y sodio). Los compuestos concominantes descritos son el sulfato de 17 α -estradiol y sodio, sulfato de 17 α -dihidroequilina y sodio y sulfato de 17 β -dihidroequilina y sodio. Las impurezas descritas son el sulfato de 17 β -estradiol y sodio, el sulfato de 17 α -dihidroequilenina y sodio, 17 β -dihidroequilenina y sodio y sulfato de

equilenina y sodio. Los estrógenos conjugados debe contener no menos del 52.5% y no más del 61.6% de sulfato de estrona y sodio, no menos del 22.5% y no más del 30.5% de sulfato de equilina y sodio, no menos del 2.5% y no más del 9.5% de sulfato de 17 α -estradiol y sodio, no menos del 13.5% y no más del 19.5% de sulfato de 17 β -dihidroequilina y sodio, no menos del 0.5% y no más del 4.0% de sulfato de 17 β -dihidroequilina y sodio. La totalidad del sulfato de estrona y sodio y de sulfato de equilina y sodio no es menos del 79.5% y no mayor del 88.0%. Todos los porcentajes se refieren al contenido indicado en la etiqueta.

3.3 ESPECIFICACIONES

Las especificaciones establecidas para el principio activo y que la materia prima adquirida del proveedor Diosynth ha de cumplir son las siguientes (tabla 3.1):

PARÁMETRO A ESTUDIAR	BIBLIOGRAFÍA	ESPECIFICACIONES	
Características organolépticas	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Polvo amorfo inodoro blanco o casi blanco	
Identificación	Propio	Tiempo retención relativo estándar \pm 0.1	
Solubilidad	Propio	Soluble en agua y Metanol	
Identificación de sodio	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Positiva	
Identificación de sulfato	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Positiva	
Valoración (en forma de sulfato sódico)	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Estrona	52.5-61.5%
		Equilina	22.5-30.5%
		Estrona + Equilina	79.5-88.0%
Sustancias concomitantes (en forma de sulfato sódico)	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	17 α -dihidroequilina	13.5-19.5%
		17 α -estradiol	2.5-9.5%
		17 β -dihidroequilina	0.5-4.0%
Impurezas* (en forma de sulfato sódico)	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	17 α -dihidroequilenina	\leq 3.25%
		17 β -dihidroequilenina	\leq 2.75%
		17- β -estradiol	\leq 2.25%
		Equilenina	\leq 5.50%
Esteroides libres	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Estrona+Equilina+17 α -dihidroequilina	\leq 1.30%
Contenido en NaCl	Propio	0.75-1.25% respecto a materia prima	
Contenido en Trometamol	Propio	35-40% respecto a materia prima	
Humedad	Propio	<2.0%	

Tabla 3.1: Especificaciones que debe cumplir la materia prima. *Según certificación del fabricante del fabricante, la materia prima no contiene Δ 8,9-deshidroestróna.

3.4 MATERIAL

Para la realización del estudio del principio activo y la elaboración de las formulaciones se utiliza como materia prima: estrógenos Conjugados del proveedor Diosynth que consiste en una dilución de estrógenos conjugados en una mezcla de cloruro de sodio y trometamol a la concentración de 565 mg de estrógenos conjugados por gramo de materia prima. A continuación, se adjunta el certificado de análisis de la materia prima.

DIOSYNTH

CERTIFICATE OF ANALYSIS

CONJUGATED ESTROGENS DE
labelclaim 565 mg/g
USP 24

Page 1 of 2

Lotnumber : L00019260

Order/line number: 18890/1

Release date : April 2001

Recent date : April 2006

Appearance	powder
Colour	white to practically white
Identification (GC)	identical with RS
Visible impurities	not present
Assay (GC) estrogen sodium sulphate (total)	529 mg/g
Assay (main components/GC) estrone sodium sulphate	318 mg/g
equilin sodium sulphate	152 mg/g
Assay (main components to label claim/GC/USP/EP) estrone sodium sulphate	56.1 %
equilin sodium sulphate	26.9 %
sum of estrone- and equilin sodium sulphate	85.0 %
Concomitant components (GC) 17a-dihydroequilin sodium sulphate	87 mg/g
17b-dihydroequilin sodium sulphate	8.5 mg/g
17a-estradiol sodium sulphate	37 mg/g
Concomitant components (to label claim/GC/USP/EP) 17a-dihydroequilin sodium sulphate	15.4 %
17b-dihydroequilin sodium sulphate	1.5 %
17a-estradiol sodium sulphate	6.6 %
Free steroids (to label claim/GC/USP/EP) total (17a-dihydroequilin/equinil/estrone)	<= 0.5 %
Loss on drying (105degC/4h)	0.4 %
Organic volatile impurities (GC)	(USP) conform requirements
Related substance (to label claim/GC/USP/EP) 17b-estradiol sodium sulphate	0.73 %
Residual solvents (GC) 1-butanol	510 ppm
diethyl ether	<= 100 ppm
methanol	<= 100 ppm
methylene chloride	<= 100 ppm
pyridine	<= 100 ppm
Signal impurities (to label claim/GC/USP/EP) 17a-dihydroequilenin sodium sulphate	0.50 %
17b-dihydroequilenin sodium sulphate	0.23 %
equilenin sodium sulphate	0.7 %
Sodium chloride (ds/TITRIM)	9 mg/g
Trometamol (ds/TITRIM)	378 mg/g

F. Verlaar
Responsible Chemist.

Figura 3.1: Certificado de análisis del fabricante de la materia prima.

a) Estándares

- Estrona, estándar Sigma-Aldrich. Lote 019H0775. Título: 99.9%
- Equilina, estándar Sigma-Aldrich. Lote 065K0958. Título: 98.0%
- 17 α -dihidroequilina, estándar USP. Lote I0C277. Título: 98.8%
- 17 β -dihidroequilina, estándar Organon. Lote CK0180K1A. Título: 99.2%
- 17 α -estradiol, estándar Sigma-Aldrich. Lote 066K4031. Título: 99.5%
- 17 β -estradiol, estándar Sigma-Aldrich. Lote 49H8801. Título: 100.1%
- 17 α -dihidroequilenina, estándar Organon. Lote GV1790K1. Título: 99.6%
- 17 β -dihidroequilenina, estándar Organon. Lote SA0136K1. Título: 99.9%
- Equilenina, estándar Organon. Lote SA0092K1B. Título: 97.4%

b) Disolventes

- Agua purificada
- Agua de calidad HPLC
- Metanol de calidad HPLC
- Acetonitrilo de calidad HPLC
- Éter etílico, calidad análisis.

c) Reactivos

- Carbonato de potasio al 15%, calidad análisis.
- Piroantimoniato de potasio, calidad análisis.
- Ácido clorhídrico 10%, calidad análisis.
- Cloruro de bario al 6%, calidad análisis.
- Ácido nítrico al 10%, calidad análisis.
- Nitrato de plata 0.02N, calidad análisis.
- Alumbre férrico-amónico saturada, calidad análisis.
- Sulfocianuro de potasio 0.02N, calidad análisis.
- Púrpura de bromocresol, calidad análisis.
- Ácido clorhídrico 0.1N, calidad análisis.
- Etilparabeno, calidad análisis.
- Ácido clorhídrico concentrado, calidad análisis.
- Bicarbonato sódico, calidad análisis.

d) Material de laboratorio

- Matraces aforados
- Vasos de precipitados
- Varillas de vidrio
- Columna cromatográfica Kromasil 100RP C18, 20 cm x 0.46 cm, 5 μ m
- Filtros de papel de celulosa Albet

e) Equipos

- Balanza analítica Metler Toledo tipo AB-135
- Estufa Heraeus Modelo T5028
- Equipo cromatográfico Waters 2690 con detector PDA 996.
- Placa calefactora Selecta Agimatic-E
- Valorador Karl-Fischer Metler DL31

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Características organolépticas

El conocimiento de las características organolépticas de la materia prima ofrece una rápida idea del buen estado aparente de la misma (91). El ensayo describirá la materia prima evaluando las siguientes características organolépticas: color, textura, aspecto y olor.

3.5.2 Solubilidad

Para comprobar la solubilidad se toma 1 g de la materia prima a analizar y se traspasan a un matraz aforado de 50 ml. Completar el volumen con metanol y agitar durante 5 minutos. Repetir la operación utilizando como disolvente agua purificada.

Especificación: la solubilidad debe ser completa.

3.5.3 Identificación de sodio

Disolver 50 mg de la materia prima en 2 ml de agua purificada. Añadir 2 ml de una solución al 15% de carbonato de potasio y calentar a ebullición. No debe de apreciarse ningún precipitado. Añadir 4 ml de una solución de piroantimoniato de potasio. Enfriar con hielo, al frotar las paredes con una varilla de vidrio debe observarse un precipitado blanco y denso.

Especificación: Debe aparecer un precipitado blanco y denso.

3.5.4 Identificación de sulfato

Disolver 50 mg de la materia prima en 2 ml de agua destilada. Añadir 1 ml de una solución al 10% de ácido clorhídrico y 1 ml de una solución al 6% de cloruro de bario. Observar la aparición de un precipitado.

Especificación: Debe aparecer un precipitado blanco.

3.5.5 Identificación y valoración de la materia prima e impurezas

La identificación y valoración que indica las diversas farmacopeas se trata de una cromatografía de gases con una previa hidrólisis enzimática. Después de realizar una búsqueda bibliográfica (92,93,94,95,96) se ha desarrollado una cromatografía de líquidos de alta eficacia con una previa hidrólisis química. La hidrólisis es necesaria por la falta de estándares en forma de sulfato de los diferentes componentes estrogénicos.

3.5.5.1 Condiciones cromatográficas

El sistema cromatográfico utilizado consiste en un Waters modelo 2695 provisto de inyector automático, horno para columnas y una bomba cuaternaria. El detector consiste en un espectrofotómetro ultravioleta del tipo PDA (photodiode array) que puede trabajar en un intervalo de longitudes de onda al mismo tiempo dando información sobre la pureza de los picos obtenidos. Para la separación de los componentes se utiliza una columna de octadecilsilano de 20 cm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 micras de acero inoxidable (por ejemplo Kromasil 100 RP C18) que se mantiene a una temperatura de constante de 27 °C.

La fase móvil está formada por una mezcla de acetonitrilo y agua en la proporción 34:66 respectivamente. La mezcla se filtra y desgasifica a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm. La fase móvil se bombea a un flujo de 2 ml por minuto. El detector ultravioleta trabaja en el intervalo de longitudes de 200 a 300 nm, como longitud de valoración se fija a 210 nm.

3.5.5.2 Soluciones necesarias

- Fase de dilución. Mezclar cantidades iguales de acetonitrilo y agua.
- Solución de HCl/ACN. Mezclar con precaución cantidades iguales de ácido clorhídrico concentrado y acetonitrilo.

3.5.5.3 Soluciones para la identificación individual

- Solución de Estrona. Pesar aproximadamente 23 mg exactamente de estrona estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de Equilina. Pesar aproximadamente 11 mg exactamente de equilina estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 α -dihidroequilina. Pesar aproximadamente 7 mg exactamente de 17 α -dihidroequilina estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 β -dihidroequilina. Pesar 10 mg exactamente de 17- β -dihidroequilina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz

aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución de 17 α -estradiol. Pesar 10 mg exactamente 17 α -estradiol estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 5 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 α -dihidroequilenina. Pesar 14 mg exactamente de 17 α -dihidroequilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 β -dihidroequilenina. Pesar 14 mg exactamente de 17 β -dihidroequilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz

aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución de 17 β -estradiol. Pesar 10 mg exactamente de 17 β -estradiol estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de Equilenina. Pesar 11 mg exactamente de Equilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 4 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de identificación del estándar interno. Pesar 25 mg de etilparabeno e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en unos 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. Tomar 1 ml de la solución anterior llevar a un tubo de 20 ml de capacidad.

Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

3.5.5.4 Soluciones de cuantificación

- Solución estándar interno. Pesar 25 mg de etilparabeno en un matraz de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta disolución completa.
- Solución estándar. Pesar exactamente 23 mg de estrona estándar, 11 mg de equilina estándar y 7 mg de 17α -dihidroequilina estándar e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir las siguientes cantidades del resto de estrógenos: 2 ml de la solución A de 17β -dihidroequilina, 5 ml de la solución A de 17α -estradiol, 2 ml de la solución A de 17α -dihidroequilenina, 2 ml de la solución A de 17β -dihidroequilenina, 2 ml de la solución A de 17β -estradiol y 4 ml de la solución A de equilenina. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior y 1 ml de la solución de estándar interno. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución problema. Pesar exactamente alrededor de 100 mg de materia prima a ensayar traspasarlos cuantitativamente a un matraz de 100 ml. Añadir 5 ml de agua y agitar manualmente hasta disolución completa. Completar el volumen con acetonitrilo. Llevar 5 ml de la solución anterior a un tubo de 20 ml, añadir 1 ml de la solución estándar interno y 1 ml de la solución de HCl/ACN. Dejar en agitación 30 minutos, transcurrido ese tiempo añadir lentamente 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución problema de estrógenos libres. Pesar exactamente 50 mg de materia prima a analizar. Traspasarlos a un tubo de 20 ml, añadir 3 ml de agua y agitar hasta disolución completa. Añadir 1 ml de solución de estándar interno y 3 ml de acetonitrilo. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

3.5.5.5 Procedimiento

Estabilizar el sistema durante al menos 30 minutos. Inyectar 50 µl de las soluciones de identificación de cada una de las soluciones de estrógenos individuales. Identificar cada uno de los estrógenos. Inyectar 50 µl de la solución de cuantificación por quintuplicado. Para considerar que el sistema cromatográfico es idóneo comprobar que la resolución entre todos los picos sea superior a 1.5, el factor de asimetría de los picos debe encontrarse entre 0.85 y 1.5 y el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas para cada uno de los estrógenos en las cinco inyecciones de la solución de estándar debe ser inferior al 2%. Una vez comprobado la idoneidad del sistema, inyectar por triplicado la solución problema y la solución problema de estrógenos libres.

3.5.5.6 Cálculos

El contenido en forma de porcentaje respecto al contenido de estrógenos totales se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\frac{C_P \times R_{PB}}{R_P} \times \frac{3 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times \frac{7 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times \frac{100 \text{ ml}}{M} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{T} \times 1.381 \times 100 = \frac{C_P \times R_{PB}}{R_P \times M \times T} \times 29$$

donde:

C_P es la concentración del estrógeno en la solución de estándar expresada en µg/ml

R_{PB} es la relación entre el área que corresponde al estrógeno y el área del estándar interno en la solución problema

R_P es la relación entre el área que corresponde al estrógeno y el área del estándar interno en la solución estándar (valor medio de las 5 inyecciones)

M es la cantidad de sustancia a ensayar pesada en el apartado de solución problema expresada en g

T es el contenido en estrógenos en mg indicado en la etiqueta por g de principio activo: 565 mg/g

1.382 es el factor para transformar los estrógenos a la forma sulfato sódico.

3.5.5.6.1 Cálculos de los estrógenos libres

Los estrógenos libres consisten en la cantidad que contiene de estrona, equilina y 17α-dihidroequilina en forma de base.

El contenido en estrógenos libres consistirá en la suma de los porcentajes de los tres estrógenos libres respecto al contenido de estrógenos totales. Se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\frac{C_P \times R_{PB}}{R_P} \times \frac{7 \text{ ml}}{M} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{T} \times 1.381 \times 100 = \frac{C_P \times R_{PB}}{R_P \times M \times T} \times 0.9667$$

donde:

C_P es la concentración del estrógeno en la solución de estándar expresada en $\mu\text{g/ml}$

R_{PB} es la relación entre el área que corresponde al estrógeno y el área del estándar interno en la solución problema de estrógenos conjugados

R_P es la relación entre el área que corresponde al estrógeno y el área del estándar interno en la solución estándar (valor medio de las 5 inyecciones)

M es la cantidad de sustancia a ensayar pesada en el apartado de solución problema expresada en g

T es el contenido en estrógenos en mg indicado en la etiqueta por g de principio activo: 565 mg/g

1.382 es el factor para transformar los estrógenos a la forma sulfato sódico.

3.5.5.7 Especificaciones

Los estrógenos conjugados deben contener no menos del 52.5% y no más del 61.5% de sulfato de estrona y sodio, y no menos del 22.5% y no más del 30.5% de equilina y sodio, no menos del 2.5% y no más del 9.5% de sulfato de 17α -estradiol y sodio, no menos del 13.5% y no más del 19.5% de sulfato de 17α -dihidroequilina y sodio, no menos del 0.5% y no más del 4.0 % de sulfato de 17β -dihidroequilina y sodio. La totalidad del sulfato de estrona y sodio y de sulfato de equilina y sodio no es menor del 79.5% y no mayor al 88.0%.

Los contenidos máximos de cada una de las impurezas es el siguiente:

- Sulfato de 17β -dihidroequilenina y sodio $\leq 2.75\%$.
- Sulfato de 17α -dihidroequilenina y sodio $\leq 3.25\%$.
- Sulfato de 17β -estradiol y sodio $\leq 2.25\%$.
- Sulfato de equilenina y sodio $\leq 5.5\%$.
- Estrona, Equilina y 17α -dihidroequilina (como esteroides libres) $\leq 1.3\%$.

3.5.6 Contenido trometamol

Pesar exactamente 200 mg y disolver en unos 30 ml de agua purificada. Añadir 5 gotas de púrpura de bromocresol TS y valorar con una solución de ácido clorhídrico 0.1N hasta viraje a color amarillo.

Cada ml de la solución clorhídrico equivale a 12.11 mg de trometamol.

3.5.6.1 Especificaciones

El contenido en trometamol debe encontrarse entre 35 al 40% respecto a la materia prima.

3.5.7 Contenido de cloruro de sodio

Pesar exactamente aproximadamente 1.0 g de materia prima a analizar. Disolver en 50 ml de agua purificada. Añadir 10 ml de una solución al 10% de ácido nítrico, 2 ml de éter etílico y 25 ml de una solución de 0.02N de nitrato de plata y agitar durante 5 minutos. Añadir 5 ml de una solución de alumbre férrico-saturada y valorar con una solución de 0.02N de sulfocianuro de potasio hasta viraje a color rojo ladrillo. Cada ml de nitrato de plata equivale a 1.170 mg de cloruro de sodio.

3.5.7.1 Especificaciones

El contenido en cloruro de sodio debe encontrarse entre 7.5-12.5 mg por gramo de materia prima.

3.5.8 Humedad

Pesar exactamente aproximadamente 20.0 mg de materia prima y determinar el contenido de agua mediante el equipo Karl-Fischer.

3.5.8.1 Especificación

El contenido en agua debe ser inferior o igual al 2%.

3.5.9 Resultados obtenidos

En la tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos al aplicar los métodos análisis a la materia prima.

Análisis	Especificaciones	Bibliografía	Resultados
Características organolépticas	Polvo amorfo inodoro blanco o casi blanco	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Polvo amorfo blanco
Solubilidad	Soluble en metano y agua	Propio	Soluble en metano y agua
Identificación de sodio	Positiva	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Positiva
Identificación de sulfatos	Positiva	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	Positiva
Humedad	Inferior 2%	Propio	0.6%
Contenido en trometamol	35-40%	Propio	38.5%
Contenido en cloruro de sodio	0.75-1.25%	Propio	1.0%
Identificación de los estrógenos principales 17β-dihidroequilina 17α-dihidroequilina 17α-estradiol Equilina Estrona	Tiempo retención relativo estándar± 0,1	Propio	Cumple
Identificación de impurezas 17β-estradiol 17β-dihidroequilenina 17α-dihidroequilenina Equilenina	Tiempo retención relativo estándar± 0,1	Propio	Cumple
Contenido de los Componentes principales (en forma de sulfato sódico) Estrona sulfato sódico Equilina sulfato sódico Suma ES+EQ	52.5-61.5% 22.5-30.5% 79.5-88%	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	58.53% 26.55% 85.08%
Contenido de los estrógenos concomitantes(en forma de sulfato sódico) 17β-dihidroequilina 17α-dihidroequilina 17α-estradiol	0.5-4% 13.5-19.5% 2.5-9.5%	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	1.52% 16.10% 6.56%
Contenido en impurezas (en forma de sulfato sódico) 17β-estradiol 17β-dihidroequilenina 17α-dihidroequilenina Equilenina	Inferior 2.25% Inferior 2.75% Inferior 3.25% Inferior 5.5%	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	0.75% 0.25% 0.53% 0.88%
Contenido en esteroides libres	Inferior 1.30%	RFE 3 ^{era} Ed. Ph Eur 5 ^a Ed.	0.43%

Tabla 3.2: Resultados del análisis de la materia prima

3.5.10 Conclusiones

Todos los resultados obtenidos para los diferentes estudios llevados a cabo en el análisis de la materia prima se encuentra dentro de las especificaciones indicadas tanto en las diferentes farmacopeas como en los ensayos propios por lo que se puede concluir que la materia prima en estudio tiene la calidad adecuada para poderla utilizar en los estudios posteriores de formulación.

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA FORMULACIÓN Y TÉCNICA DE ELABORACIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN

Se pretende desarrollar un comprimido que contenga 0.625 mg de estrógenos conjugados que cumpla el perfil de disolución "in vitro" indicado por la USP 29 (97). El perfil de disolución fijado de estrona sulfato sódico disuelta es el siguiente:

- b) A las 2 horas entre el 19% y el 49% de estrona sulfato sódico disuelto.
- c) A las 5 horas entre el 66% y el 96% de estrona sulfato sódico disuelto.
- d) A las 8 horas no menos del 80% de estrona sulfato sódico disuelto.

Antes de iniciar el estudio de la formulación por causa tecnológicas y comerciales el comprimido debe ser cilíndrico biconvexo de 8 mm de diámetro y de color rojo. Para conseguir el perfil de disolución se plantea la formulación de comprimidos de liberación controlada basado en una matriz hidrófila y posterior recubrimiento que puede ser totalmente soluble con poco efecto sobre la liberación o que contribuya a dotar al comprimido de las características de velocidad de disolución deseado. Se elige este tipo de comprimidos debido a que la tecnología necesaria para su elaboración es sencilla y disponible.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Materias primas

El principio activo utilizado es del proveedor Diosynth y ha sido analizado en el Capítulo 3: Estudio experimental del principio activo. Los excipientes utilizados en el estudio de la formulación son habituales y ampliamente utilizados en la elaboración de formas sólidas (98). La elección de los excipientes se completa con un estudio bibliográfico de cada uno de ellos.

4.2.1.1 Lactosa monohidrato y anhidra

4.2.1.1.1 Categoría funcional

Agente aglutinante y/o diluyente en comprimidos y cápsulas.

4.2.1.1.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

La lactosa se utiliza generalmente es ampliamente usada como diluyente en comprimidos y cápsulas. En el mercado existen diferentes grados de lactosa con propiedades físicas diferentes tales como el tamaño de partícula y capacidad de flujo. La lactosa anhidra se puede usar junto con principios activos sensibles a la humedad a causa de su bajo contenido en agua. Algunos grados de lactosa se utilizan para la elaboración de comprimidos por compresión directa. También se utiliza como diluyente en inhaladores de polvo y en la formulación de liofilizados.

4.2.1.1.3 Estabilidad

En condiciones de alta humedad relativa (80%) puede alterarse por lo tanto se debe conservarse en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.1.4 Incompatibilidades

En presencia de aminas primarias puede dar a lugar a Reacciones de Maillard formando compuestos de color marrón.

4.2.1.1.5 Conclusiones

Por sus características físicas, la lactosa es un excipiente idóneo para la formulación de este tipo de comprimidos.

4.2.1.2 Celulosa microcristalina

4.2.1.2.1 Categoría funcional

Adsorbente, agente suspensor, diluyente y/o aglutinante en comprimidos y cápsulas

4.2.1.2.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

La celulosa microcristalina se utiliza generalmente como diluyente y/o aglutinante en la elaboración de comprimidos por compresión directa y granulación húmeda a una concentración entre el 20% y 90%. También posee propiedades como disgregante y lubricante en la elaboración de comprimidos. En el caso de utilizarse como disgregante la concentración se encuentra entre el 5% y el 15% mientras que como lubricante se utiliza a una concentración entre el 5% y el 20%.

4.2.1.2.3 Estabilidad

La celulosa microcristalina es estable aunque higroscópica por lo que debe conservarse en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.2.4 Incompatibilidades

La celulosa microcristalina es incompatible con la presencia de agentes fuertemente oxidantes.

4.2.1.2.5 Conclusiones

Por sus características físicas, la celulosa microcristalina es excipiente idóneo para la formulación de este tipo de comprimidos, sin que se describan incompatibilidades con el resto de excipientes.

4.2.1.3 Povidona

4.2.1.3.1 Categoría funcional

Agente suspensor, disgregante y aglutinante en comprimidos.

4.2.1.3.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

La povidona en forma de solución o polvo seco se utiliza como aglutinante en la elaboración de comprimidos por granulación húmeda o compresión directa. La povidona aumenta la solubilidad de principios activos con baja solubilidad en formulaciones orales y tópicas. La povidona se utiliza como agente de recubrimiento.

La povidona se utiliza como agente suspensor, estabilizante y viscosizante en soluciones y suspensiones orales y tópicas.

Se usa a las concentraciones siguientes: como solubilizante entre el 10% y el 25%; como agente dispersante mas del 5%; como agente suspensor mas del 5%, como diluyente, aglutinante o agente de recubrimiento entre 0.5% y el 5%.

4.2.1.3.3 Estabilidad

La povidona debe almacenarse en lugares frescos y secos en recipientes herméticos

4.2.1.3.4 Incompatibilidades

En general la povidona es compatible en solución con una amplia gama de sales inorgánicas, resinas naturales y sintéticas. Puede formar complejos con sulfatiazol, cloranfenicol, salicilato sódico y fenobarbital, que pueden ser causa de inactividad. Reduce la eficacia de algunos conservantes como el timersol y los parabenos al formar complejos con la povidona.

4.2.1.3.5 Conclusiones

En las formulaciones se utiliza como aglutinante en la elaboración de comprimidos previa granulación húmeda acuosa. No se describen incompatibilidades con el resto de excipientes.

4.2.1.4 Hipromelosa o hidroxipropilmetilcelulosa

4.2.1.4.1 Categoría funcional

Agente de recubrimiento, filmógeno, polímero en formulaciones de liberación controlada, agente estabilizante, agente suspensor, aglutinante en comprimidos y viscosizante.

4.2.1.4.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

En formulaciones orales principalmete se utiliza como aglutinante, agente filmógeno y matriz para formulaciones de liberación controlada. Concentraciones entre 2% y el 5% pueden utilizarse como aglutinante en granulación seca y húmeda. La hipromelosa de alta viscosidad se puede utilizar como matriz en formulaciones de liberación controlada.

Dependiendo el grado de viscosidad, concentraciones entre el 2% y 20% pueden utilizarse como agente filmogeno en el recubrimiento de comprimidos.

La hipromelosa se puede utilizar como emulgente, agente suspensor y agente estabilizante en geles tópicos y pomadas.

4.2.1.4.3 Estabilidad

La hipromelosa es un material estable aunque higroscópico por ello se debe almacenarse en recipientes herméticos en lugares secos y fríos.

4.2.1.4.4 Incompatibilidades

La hipromelosa es incompatible con agentes oxidantes.

4.2.1.4.5 Conclusiones

En las formulaciones estudiadas la hipromelosa se utiliza como matriz para los comprimidos de liberación controlada y como agente de recubrimiento.

4.2.1.5 Sílice coloidal anhidra

4.2.1.5.1 Categoría funcional

Agente suspensor, floculante y viscosizante en suspensiones, estabilizador en emulsiones y adsorbente, agente deslizante y disgregante en comprimidos.

4.2.1.5.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza en cosmética, alimentación y productos farmacéuticos. Su tamaño de partícula facilita la adsorción de humedad residual y facilita el deslizamiento del polvo o granulado facilitando el proceso de compresión. Las concentraciones usadas se hallan comprendidas entre 0.1% y 0.5%. También se usa como disgregante.

El sílice coloidal se puede utilizar como estabilizante, viscosizante y agente suspensor en geles y preparaciones semisólidas. En el caso de actuar como estabilizante se utiliza en una concentración entre el 1% y el 5%, como agente suspensor o viscosizante se utiliza en una concentración entre 2.0 y el 10%.

El sílice coloidal se puede utilizar en la formulación de aerosoles tópicos como promotor de la suspensión de las partículas y minimizar el atascamiento de los pulsadores. La concentración en estos casos se encuentra entre el 0.5 y el 2.0%.

El sílice coloidal se puede utilizar en la formulación de supositorios que contengan excipientes lipofílicos para aumentar la viscosidad, prevención de la sedimentación y disminución de la liberación del principio activo.

4.2.1.5.3 Estabilidad

Deberá almacenarse en recipientes secos al abrigo de la humedad.

4.2.1.5.4 Incompatibilidades

El sílice coloidal es incompatible con el dietilbestrol.

4.2.1.5.5 Conclusiones

En las formulaciones estudiadas la sílice coloidal se utiliza como regulador de flujo de las mezclas de polvos y granulados.

4.2.1.6 Talco

4.2.1.6.1 Categoría funcional

Agente floculante y diluyente, lubricante y regulador de flujo en comprimidos y cápsulas.

4.2.1.6.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

El talco se utiliza en formas sólidas orales como lubricante y diluyente. La concentración usada como lubricante se encuentra entre 1% y el 10% mientras que como diluyente la concentración se encuentra entre el 5% y el 30%.

4.2.1.6.3 Estabilidad

El talco debe almacenarse en recipientes herméticos en lugar fresco y seco.

4.2.1.6.4 Incompatibilidades

El talco es incompatible con aminas cuaternarias.

4.2.1.6.5 Conclusiones

Se utiliza en las formulaciones por sus características como regulador de flujo y lubricante.

4.2.1.7 Estearato de magnesio

4.2.1.7.1 Categoría funcional

Lubrificante en comprimidos y cápsulas.

4.2.1.7.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza como lubricante a una concentración entre 0.25% y 5.00%.

4.2.1.7.3 Estabilidad

El estearato de magnesio debe almacenarse en recipientes herméticos en lugar fresco y seco.

4.2.1.7.4 Incompatibilidades

El estearato de magnesio es incompatible con ácidos fuertes, bases y sales de hierro. Se han descrito incompatibilidades con formulaciones que contengan ácido acetilsalicílico, algunas vitaminas y la mayoría de sales de alcaloides.

4.2.1.7.5 Conclusiones

El estearato de magnesio es un lubricante idóneo para comprimidos. Se encuentra en las formulaciones a la concentración establecida y no presenta incompatibilidades con los demás componentes de las formulaciones.

4.2.1.8 Etilcelulosa

4.2.1.8.1 Categoría funcional

Agente de recubrimiento, aglutinante en comprimidos, viscosizante y fijador de aromas.

4.2.1.8.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza como agente de recubrimiento hidrófobo en comprimidos de liberación controlada a una concentración entre 3% y 20%. Etilcelulosas de alta viscosidad se pueden utilizar para elaborar microcápsulas a una concentración entre 10% y 20%. Como aglutinante en la elaboración de comprimidos se utiliza a una concentración entre 1% y 3%.

4.2.1.8.3 Estabilidad

La etilcelulosa debe conservarse a temperaturas inferiores a 32 °C.

4.2.1.8.4 Incompatibilidades

La etilcelulosa es incompatible con la parafina.

4.2.1.8.5 Conclusiones

Se utiliza en las formulaciones por sus características como agente de recubrimiento hidrófobo.

4.2.1.9 Trietilcitrate

4.2.1.9.1 Categoría funcional

Plastificante

4.2.1.9.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza como plastificante en la elaboración de comprimidos recubiertos.

4.2.1.9.3 Estabilidad

La trietilcitrate es estable si se conserva en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.9.4 Incompatibilidades

El trietilcitrate es incompatible con bases fuertes y sustancias oxidantes.

4.2.1.9.5 Conclusiones

Se utiliza en las formulaciones como plastificante en la formulación de los recubrimientos.

4.2.1.10 Dióxido de titanio

4.2.1.10.1 Categoría funcional

Agente de recubrimiento y opacificante.

4.2.1.10.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

En la formulación de recubrimientos, el dióxido de titanio se utiliza como pigmento blanco y opacificante.

4.2.1.10.3 Estabilidad

El dióxido de titanio desprende pequeñas cantidades de oxígeno si se expone a la radiación lumínica. Debe almacenarse en recipientes herméticos en lugares frescos, secos y protegido de la luz.

4.2.1.10.4 Incompatibilidades

Por efecto de la luz, el dióxido de titanio interacciona con la famotidina. Puede inducir la fotooxidación de grasas insaturadas.

4.2.1.10.5 Conclusiones

Se utiliza en las formulaciones como opacificante en la formulación de los recubrimientos.

4.2.1.11 Lauril sulfato sódico

4.2.1.11.1 Categoría funcional

Tensiactivo aniónico, emulgente, detergente, agente humectante y lubricante en la elaboración de comprimidos.

4.2.1.11.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza a las concentraciones siguiente: como emulgente entre 0.5% y 2.5%; como lubricante entre 1% y 2%.

4.2.1.11.3 Estabilidad

Debe almacenarse en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.11.4 Incompatibilidades

El lauril sulfato sódico reacciona con emulgentes catiónicos, causando pérdida de actividad. El lauril sulfato sódico es incompatible con algunas sales de alcaloides y precipita en presencia de sales de plomo y de potasio.

4.2.1.11.5 Conclusiones

Se utiliza en las formulaciones como lubricante.

4.2.1.12 Polimetacrilatos

4.2.1.12.1 Categoría funcional

Filmógeno, diluyente y/o aglutinante en comprimidos

4.2.1.12.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Generalmente se utiliza en formulaciones de recubrimientos, dependiendo de las características del polímero, el recubrimiento posee diferentes características de solubilidad. Se utiliza como aglutinante en procesos de granulación húmeda acuosa y anhidra. En forma sólida se utiliza como matriz para la elaboración de comprimidos de liberación controlada a una concentración entre 5% y el 20%. También se utiliza como matriz para sistemas de liberación transdérmica.

4.2.1.12.3 Estabilidad

En forma de polvo es estable a temperaturas inferiores de 30 °C. En forma de dispersión debe conservarse entre 5 °C y 25 °C. Se debe almacenar en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.12.4 Incompatibilidades

Las dispersiones pueden ser incompatibles con soluciones de electrolitos.

4.2.1.12.5 Conclusiones

En las formulaciones se utiliza como agente de recubrimiento.

4.2.1.13 Fosfato bicálcico

4.2.1.13.1 Categoría funcional

Diluyente en comprimidos.

4.2.1.13.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Generalmente se utiliza como diluyente en la elaboración de comprimidos por compresión directa. Por sus propiedades abrasivas es necesario incluir en la formulación de lubricantes.

4.2.1.13.3 Estabilidad

Se debe almacenar en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.13.4 Incompatibilidades

El fosfato bicálcico es incompatible con indometacina, ácido acetilsalicílico, aspartamo, ampicilina, cefalexina, eritromicina y tetraciclinas.

4.2.1.13.5 Conclusiones

En las formulaciones se utiliza como diluyente para procesos de compresión directa.

4.2.1.14 Glicolato sódico de almidón

4.2.1.14.1 Categoría funcional

Disgregante en comprimidos.

4.2.1.14.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

El glicolato sódico de almidón se utiliza como disgregante en la elaboración de comprimidos por compresión directa y granulación húmeda. La concentración debe encontrarse entre 2% y el 8%.

4.2.1.14.3 Estabilidad

Se debe almacenar en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.14.4 Incompatibilidades

El glicolato sódico de almidón es incompatible con el ácido ascórbico.

4.2.1.14.5 Conclusiones

En las formulaciones se utiliza como disgregante en comprimidos.

4.2.1.15 Aceite de ricino

4.2.1.15.1 Categoría funcional

Lubrificante en comprimidos y como agente de recubrimiento.

4.2.1.15.2 Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas

Se utiliza como recubrimiento o como matriz para la elaboración de comprimidos de liberación controlada en el caso de recubrimiento a una concentración entre el 5% y el 20% mientras que como matriz a una concentración entre el 5% y el 10%. Como lubricante se utiliza a una concentración entre 0.1% y 2%.

4.2.1.15.3 Estabilidad

Se debe almacenar en recipientes herméticos en lugares frescos y secos.

4.2.1.15.4 Incompatibilidades

El aceite de ricino es incompatible con la mayoría de ceras vegetales y animales.

4.2.1.15.5 Conclusiones

En las formulaciones se utiliza en la formulación del recubrimiento orgánico de los comprimidos.

4.2.2 Estándares

- Estrógenos conjugados, estándar secundario

4.2.3 Disolventes

- Agua purificada
- Agua de calidad HPLC
- Metanol de calidad HPLC
- Acetonitrilo de calidad HPLC

4.2.4 Reactivos

- Dihidrogenofosfato de potasio, calidad análisis Panreac
- Fluoximesterona, calidad análisis Panreac

4.2.5 Material de laboratorio

- Embudo de determinación de la capacidad de flujo.
- Embudo de determinación del ángulo de reposo.
- Material aforado: Matraces y pipetas.
- Vasos de precipitados.
- Varillas de vidrio.
- Columna cromatográfica Kromasil 100RP C18, 20 cm x 0.46 cm, 5 μm .
- Columna cromatográfica Techinert ODS C18, 30mm x 0.46 cm, 3 μm .
- Pie de rey.
- Filtros de peonza de acetato de celulosa.

4.2.6 Equipos

- Volumenómetro Erweka SVM 202
- Balanza analítica Metler Toledo tipo AB-135
- Estufa Heraus Modelo T5028
- Durómetro Pharmatest PTB 511E
- Balanza Sartorius modelo CPA6202P
- Equipo cromatográfico Waters 2690 con detector PDA 996.
- Placa calefactora Selecta Agimatic-E
- Bombo de recubrir Accelacota Lab.
- Maquina de comprimir Manesty Unipress Diamond 27st CFC (Controlled Force compact)
- Tamizadora Erweka AR-400
- Mezclador en V Lleal
- Amasadora doble Z Turu AM6
- Aparato de disolución Erweka DT700
- Estufa Selecta modelo 2978
- Granuladora de húmedos Turu Grau
- Balanza Sartorius BP221S
- Cromatógrafo de líquidos Waters 2695.
- Aparato de friabilidad Erweka

4.3 METODOLOGÍA

Se plantean dos métodos diferentes de elaboración del núcleo: compresión directa y granulación por vía húmeda. La compresión directa consiste en una técnica sencilla y rápida pero se debe tener especial atención en la homogeneidad de la mezcla de componentes. La granulación húmeda favorece el reparto homogéneo del principio activo en la formulación, ya que éste se encuentra en un porcentaje muy pequeño y proporciona un granulado que posee mejores características reológicas que una mezcla simple de polvos.

Una vez elaborados los núcleos, se desarrolla el recubrimiento que consiste en un simple recubrimiento acuoso de color que no influye en la liberación del principio activo o un recubrimiento inicial orgánico que influye en la liberación del principio activo y un posterior recubrimiento acuoso de color.

Para valorar las formulaciones realizadas se estudiarán las siguientes características galénicas de los comprimidos y mezclas de polvos:

- Fase de polvos:
 - Capacidad de flujo.
 - Ángulo de reposo
 - Densidad aparente compactada y sin compactar
 - Humedad
- Fase de comprimidos:
 - Uniformidad de de masa
 - Dureza
 - Friabilidad
 - Contenido
 - Uniformidad de contenido
 - Velocidad de disolución

4.3.1 Determinación de la capacidad de flujo

El ensayo de capacidad de flujo tiene por objetivo determinar la capacidad de sólidos divididos para fluir verticalmente, bajo condiciones definidas.

4.3.1.1 Procedimiento

Para el ensayo se utiliza un embudo de vidrio de dimensiones bien definidas (figura 4.1) siguiendo el procedimiento indicado en la Farmacopea Europea (83) y Real Farmacopea Española (82).

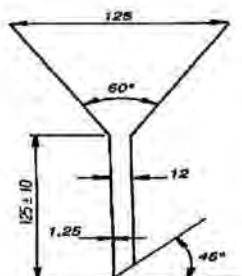


Figura 4.1: Dimensiones en mm del embudo de capacidad de flujo.

Introducir 100.0 g de la muestra a analizar sin compactar en el embudo totalmente seco, cuyo orificio inferior ha sido bloqueado por un medio adecuado. Destapar el

embudo por la parte inferior y medir el tiempo necesario para que toda la muestra salga del embudo. La determinación debe realizarse por triplicado.

4.3.1.2 Expresión de los resultados

La capacidad de flujo se expresa en segundos y décimas de segundo con relación a 100 g de muestra. Se presenta la media de los tres resultados y el coeficiente de variación.

4.3.2 Determinación del ángulo de reposo

El ensayo del ángulo de reposo tiene como objetivo calcular el ángulo del cono formado por la muestra al caer a través de un embudo (figura 4.2)

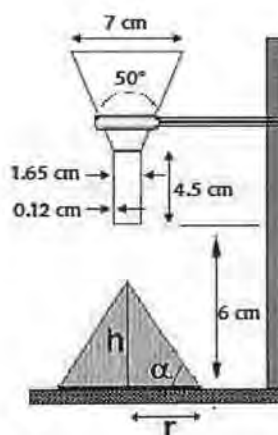


Figura 4.2: Montaje y dimensiones en cm para el ensayo de ángulo de reposo.

4.3.2.1 Procedimiento

Montar el embudo tal y como indica la figura. Introducir 25 g de la muestra a analizar sin compactar en el embudo totalmente seco, cuyo orificio inferior ha sido bloqueado por un medio adecuado. Destapar el embudo por la parte inferior y medir el radio y la altura del cono formado. Calcular el ángulo de reposo mediante la siguiente fórmula.

$$\arctan \alpha = \frac{h \text{ (altura del cono)}}{r \text{ (radio del cono)}}$$

La determinación se realiza por triplicado.

4.3.2.2 Expresión de los resultados

El ángulo de reposo se expresa en grados y se presenta la media de los tres resultados y el coeficiente de variación. Para la evaluación del ángulo de reposo se aplica el criterio de la Farmacopea Europea (99) que se muestra en la tabla 4.1.

Características de flujo	Ángulo de reposo (°)
Excelente	25-30°
Buena	31-35°
Bastante buena	36-40°
Pasable	41-45°
Mediocre	46-55°
Muy Mediocre	56-65°
Extremadamente mediocre	>66°

Tabla 4.1. Clasificación de la capacidad de flujo basada en el ángulo de reposo.

4.3.3 Ensayo de densidad aparente sin compactar y compactada

El ensayo de densidad aparente tiene como objetivo determinar, bajo condiciones definidas, los volúmenes aparentes antes y después de sedimentar.

4.3.3.1 Procedimiento

Se sigue el procedimiento indicado en la Farmacopea Europea (83) y Real Farmacopea Española (82). Introducir en la probeta del volumenómetro totalmente seca 100.0 g de la sustancia a analizar. Anotar el volumen ocupado por la muestra sin sedimentar V_0 . Efectuar 500 y 1250 golpes y anotar los correspondientes volúmenes V_{500} y V_{1250} . Si la diferencia entre V_{500} y V_{1250} es mayor que 2 ml, seguir hasta 2500 golpes y anotar el V_{2500} que se considerará como V_f . Si la diferencia es igual o menor de 2, se considerará V_{1250} como V_f .

4.3.3.2 Expresión de los resultados

Con los resultados obtenidos calcular el índice de Hausner y el índice de Carr's o compresibilidad (%) según las siguientes formulas:

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{V_0}{V_f}$$

$$\text{Índice de Carr's} = \frac{V_0 - V_f}{V_f}$$

Para la evaluación del ángulo de reposo se aplica el criterio de la Farmacopea Europea (99) que se muestra en la tabla 4.2.

Índice de compresibilidad	Características de flujo	Índice de Hausner
1-10%	Excelente	1.00-1.11
11-15%	Buena	1.12-1.28
16-20%	Bastante buena	1.19-1.25
21-25%	Pasable	1.26-1.34
26-31%	Mediocre	1.35-1.45
32-37%	Muy Mediocre	1.46-1.59
>38	Extremadamente Mediocre	>1.60

Tabla 4.2. Clasificación de la capacidad de flujo basada en el índice de Hausner y Compresibilidad.

4.3.4 Humedad

4.3.4.1 Procedimiento

Pesar 1.0 g de polvo o triturado de comprimidos. Mantener en una estufa a 100 °C hasta peso constante.

4.3.4.2 Expresión de los resultados

Calcular el porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial.

4.3.5 Uniformidad de masa

Para realizar el ensayo de uniformidad de masa se sigue la Real Farmacopea Española (82) en el apartado de uniformidad de masa de las preparaciones presentadas en dosis únicas.

El control de la uniformidad de masa de los comprimidos es un parámetro utilizado usualmente como punto de control en proceso en la fabricación de comprimidos. La existencia de variaciones fuera de los límites establecidos para la masa de los comprimidos indica una incorrecta alimentación de la matriz con la consiguiente mala dosificación y variaciones excesivas de las presiones aplicadas dando lugar a durezas variables, así como también posibles variaciones en el contenido de principio activo.

4.3.5.1 Procedimiento

Pesar individualmente 20 comprimidos escogidos al azar en una balanza con una precisión ± 0.1 mg.

4.3.5.2 Expresión de los resultados

Determinar la masa media. La masa individual de como máximo 2 comprimidos de las 20 unidades puede desviarse de la masa media en un porcentaje más elevado que el indicado en la tabla 4.3; pero la masa de ninguna unidad puede desviarse en más del doble de este porcentaje.

FORMA FARMACÉUTICA	MASA MEDIA	LÍMITES DE DESVIACIÓN (% masa media)
Comprimidos sin cubierta y comprimidos pelliculares	80 mg o menos	10.0%
	Menos de 80 y menos de 250 mg	7.5%
	250 mg o más	5.0%

Tabla 4.3: Límites permitidos para la desviación del de masa en el ensayo de uniformidad de masa según la RFE.

Indicar la masa media, los límites de la masa media y los resultados mínimo y máximo de la masa individual de los comprimidos.

4.3.6 Resistencia a la rotura

Para realizar el ensayo de resistencia a la rotura se sigue la Real Farmacopea Española (82) en el apartado de resistencia a la rotura de comprimidos.

Este ensayo tiene como finalidad la determinación en condiciones definidas, de la resistencia a la rotura de los comprimidos, medida como la fuerza necesaria para provocar su rotura por aplastamiento.

El ensayo de resistencia a la rotura de los comprimidos consiste en un parámetro utilizado usualmente como punto del control en proceso en la fabricación de comprimidos. La existencia de durezas muy variables nos indica una posible mala alimentación de la matriz con la consiguiente mala dosificación y variaciones excesivas de las presiones aplicadas dando a lugar a durezas variables.

4.3.6.1 Procedimiento

Efectuar la medida sobre 10 comprimidos tomados al azar.

4.3.6.2 Expresión de los resultados

Indicar dureza media, valor mínimo y máximo de las fuerzas medidas, todas ellas expresadas en newtons.

4.3.7 Ensayo de Friabilidad

Este ensayo determina en condiciones definidas, de la resistencia de los comprimidos frente a la erosión bajo el efecto de choques o de roces. La finalidad del ensayo es poder cuantificar las pérdidas que puedan sufrir los comprimidos durante su elaboración que consta de un etapa de recubrimiento en el cual los comprimidos sufren una agresión adicional a las agresiones normales en el transcurso del su acondicionamiento, su almacenamiento, su transporte y su comercialización.

4.3.7.1 Procedimiento

El ensayo se realiza sobre 20 comprimidos a los que se les ha eliminado el polvo por medio de una brocha suave. Pesar conjuntamente los 20 comprimidos y situarlos en el interior del tambor del equipo y dejar girar durante 4 minutos a velocidad de 25 rpm efectuando así 100 revoluciones. Transcurrido el tiempo recoger la muestra y volver a eliminar el polvo adherido por medio de una brocha suave. Volver a pesar la muestra. En el caso que los resultados son dudosos o la pérdida es superior al 1%, repetir el ensayo otras dos veces y calcular la media de los tres resultados.

4.3.7.2 Expresión de los resultados

La friabilidad se expresa como la pérdida de masa y se calcula como porcentaje de la masa inicial y anotar si se observa que alguno de los comprimidos se ha roto o exfoliado.

4.3.8 Contenido

La USP 29 (97) indica para este ensayo una cromatografía de gases con una previa hidrólisis enzimática. Para realizar este ensayo se adapta la técnica analítica que indica la farmacopea para el ensayo de disolución que consiste en una cromatografía líquida de alta resolución que ha sido validada en el Capítulo 5: Puesta a punto y validación de los métodos analíticos por HPLC.

4.3.8.1 Condiciones cromatográficas

- Columna: Kromasil 100 C18, 20 x 0,45 cm; 5 µm de tamaño de partícula.
- Fase móvil: Acetonitrilo:Solución 0.025M de dihidrogenofosfato de potasio* (25:75)

*Preparación de la solución reguladora: Pesar 3.4 g de dihidrogenofosfato de potasio y se disuelven en 1000 ml de agua calidad HPLC. Esta

solución se filtra a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm .

- Flujo: 2 ml/min
- Longitud de onda: 210 nm
- Volumen de inyección: 20 μl
- Temperatura: 30 $^{\circ}\text{C}$

4.3.8.2 Soluciones necesarias

4.3.8.2.1 Solución de estrógenos conjugados

Pesar exactamente 60 mg de estrógenos conjugados (estándar secundario). Llevar a un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

4.3.8.2.2 Solución de estándar interno

Pesar exactamente 80 mg de fluoximesterona. Llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta completa disolución.

4.3.8.2.3 Solución de estándar

Llevar 2 ml de la solución de estrógenos conjugados y 2 ml de la solución de estándar interno a un matraz aforado de 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y completar el volumen con fase móvil. Filtrar la solución a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de tamaño de 0.45 μm . Las concentraciones teóricas de estrona sulfato sódica y equilina sulfato sódica son 15.84 y 7.392 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

4.3.8.2.4 Solución problema

Pesar 20 comprimidos y calcular el peso medio. A continuación pasarlos a un mortero y triturar hasta conseguir un polvo lo más finamente posible. Del polvo obtenido, pesar la cantidad correspondiente a 1.11 mg de principio activo (equivalente al peso medio de un comprimido) y llevarlo a un matraz aforado 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y mantener en el ultrasonidos durante 5 minutos. Pasado este tiempo y una vez atemperado el matraz completar el volumen con fase móvil. Agitar durante 5 minutos y filtrar a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de 0.45 μm . Realizar la solución problema por triplicado.

4.3.8.3 Desarrollo cromatográfico

Injectar 5 replicados de la solución estándar y comprobar la idoneidad del sistema instrumental. Para ello las cinco inyecciones deben cumplir los siguientes parámetros:

- Coeficiente de variación del tiempo de retención debe ser inferior al 1%
- Coeficiente de variación de la respuesta de la estrona y equilina debe ser inferior al 2%
- Resolución superior a 1.5 entre los picos contiguos.
- Factor de simetría: 0.85-1.5
- Platos teóricos superiores a 2000.

4.3.8.4 Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como el porcentaje de las cantidades de estrona y equilina respecto al contenido teórico de los tres replicados, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contenido} = \frac{\text{Respuesta Problema}}{\text{Respuesta media referencia}} \times \frac{\text{Concentración referencia}}{\text{Concentración teórica muestra}} \times 100$$

4.3.8.5 Especificaciones

La especificación fijada para la valoración del contenido de estrona sulfato sódica y equilina sulfato sódica ha de estar comprendido entre 95-105%.

4.3.9 Uniformidad de contenido

4.3.9.1 Soluciones necesarias

4.3.9.1.1 Solución estándar

Pesar exactamente 60 mg de estrógenos conjugados (estándar secundario). Llevar a un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

4.3.9.1.2 Solución de estándar interno

Pesar exactamente 80 mg de fluoximesterona. Llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta completa disolución.

4.3.9.1.3 Solución de referencia

Llevar 2 ml de la solución de estrógenos conjugados y 2 ml de la solución de estándar interno a un matraz aforado de 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y completar el volumen

con fase móvil. Filtrar la solución a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de tamaño de 0.45 µm. Las concentraciones teóricas de estrona sulfato sódica y equilina sulfato sódica son 15.84 y 7.392 µg/ml, respectivamente.

4.3.9.1.4 Solución problema

Introducir un comprimido en un matraz aforado de 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y agitar vigorosamente hasta conseguir la disgregación del comprimido. Una vez disgregado el comprimido, colocar el matraz en el ultrasonidos durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo dejar enfriar el matraz y añadir 2 ml de la solución de estándar interno. Completar el volumen con la fase móvil y filtrar la muestra por un filtro de peonza de acetato de celulosa de 0.45 µm. Realizar esta operación con 10 comprimidos.

4.3.9.2 Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de las cantidades de estrona y equilina respecto al contenido teórico, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contenido} = \frac{\text{Respuesta Problema}}{\text{Respuesta media referencia}} \times \frac{\text{Concentración referencia}}{\text{Concentración teórica muestra}} \times 100$$

4.3.9.3 Especificaciones

Los valores obtenidos han de cumplir con las condiciones fijadas en la RFE 3^{era}ed. (82) y Ph. Eur. 5^aed. (83) para la uniformidad de contenido de preparaciones presentadas en dosis única. La preparación cumple con el ensayo cuando el contenido individual de cada unidad está comprendido entre el 85% y el 115% del contenido medio. La preparación no satisface el ensayo cuando más de uno de los contenidos individuales está fuera de estos límites o bien si uno de los contenidos individuales está fuera de los límites 75%-125% del contenido medio. Si uno de los contenidos individuales está fuera de los límites 85%-115% pero dentro de los límites 75%-125%, se ha de volver a realizar el ensayo con 20 unidades más tomadas al azar. La preparación cumple con el ensayo cuando no más de uno de los contenidos individuales de las 30 unidades analizadas queda fuera de los límites 85%-115% del contenido medio y ninguna está fuera de los límites 75%-125% del contenido medio.

4.3.10 Ensayo de disolución

Se sigue la monografía indicada por la USP 29 (97) en el ensayo 1 para comprimidos que contienen 0.625 mg de estrógenos conjugados.

4.3.10.1 Condiciones del ensayo

- Medio de disolución: Agua purificada desaireada
- Volumen de disolución: 900 ml
- Temperatura: 37 °C
- Aparato: tipo 2, palas
- Velocidad: 50 rpm
- Toma de muestra: 2, 5 y 8 horas
- Volumen de muestra: 5 ml
- Volumen de reposición: 5 ml de agua purificada desaireada a 37 °C.

4.3.10.2 Condiciones cromatograficas

- Columna: Techinert ODS C18, 30mm x 0.46 cm, 3 µm de tamaño partícula.
- Fase móvil: Acetonitrilo : Solución 0.025 de dihidrogenofosfato de potasio* (25:75)

*Preparación de la solución reguladora: Pesar 3.4 g de dihidrogenofosfato de potasio y se disuelven en 1000 ml de agua calidad HPLC. Esta solución se filtra a través de in filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm.

- Flujo: 2 ml/min
- Longitud de onda: 210 nm
- Volumen de inyección: 20 µl
- Temperatura: 30 °C

4.3.10.3 Soluciones necesarias

4.3.10.3.1 Solución estándar

Pesar 10 comprimidos y introducirlos en un matraz aforado de 1000 ml. Completar el volumen con agua y agitar vigorosamente durante 3 horas. Filtrar por papel aproximadamente 200 ml. Tomar 100 ml de solución y llevarlos a un matraz aforado de 900 ml y completar el volumen con agua.

4.3.10.3.2 Solución problema

Introducir 1 comprimido en cada uno de los vasos del equipo de disolución. Tomar una alícuota de 5 ml en cada uno de los tiempos indicados anteriormente.

4.3.10.4 Desarrollo cromatográfico

Inyectar 5 replicados de la solución estándar. Para comprobar la idoneidad del sistema calcular el coeficiente de variación que debe ser inferior al 1.5% y la resolución entre el pico de la estrona y la equilina debe ser superior a 1.5%.

4.3.10.5 Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de estrona sulfato sódico disuelta respecto al contenido teórico.

Para cumplir la especificación de disolución indicada por la USP 29 (97) debe cumplirse los siguientes porcentajes de disolución:

- A las 2 horas debe disolverse entre el 19% y el 49%.
- A las 5 horas entre el 66% y el 96%.
- A las 8 horas más del 80%.

4.4 FORMULACIONES Y TÉCNICAS DE ELABORACIÓN

4.4.1 Formulaciones de la serie 10

El inicio del estudio de la formulación se plantea mediante una granulación por vía húmeda favoreciendo de esta manera el reparto homogéneo del principio activo, ya que éste se encuentra en un porcentaje muy pequeño en la formulación. El excipiente elegido para formar la base de la matriz hidrófila es la hipromelosa (Methocel E5 premium) y el resto de excipientes ensayados son ampliamente utilizados en la elaboración de comprimidos. La combinación de los excipientes da lugar a las formulaciones de la serie experimental que se muestran en la tabla 4.4 y 4.5.

Componentes	FORMULACIONES		
	10	11	12
Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg	0.625 mg	0.625 mg
Hipromelosa (Methocel E5 premium)	40.00 mg	50.00 mg	55.00 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH 101)	86.39 mg	76.39 mg	71.39 mg
Silice coloidal(Aerosil 200)	0.50 mg	0.50 mg	0.50 mg
Polivinilpirrolidona (K-30)	4.30 mg	4.30 mg	4.30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH 102)	48.74 mg	48.74 mg	48.74 mg
Talco	16.00 mg	16.00 mg	16.00 mg
Estearato de magnesio	2.96 mg	2.96 mg	2.96 mg
Peso comprimido	200.00 mg	200.00 mg	200.00 mg

Tabla 4.4: Formulaciones de los núcleos de la serie experimental 10.

Formulación del recubrimiento			
Etilcelulosa (Aquacoat ECD)		150 g	150 g
Hidroxipropilmetilcelulosa (Pharmacoat 606)		150 g	150 g
Trietilcitrato		30 g	30 g
Dioxido de titanio		20 g	20 g
Rojo Sicopharm		15 g	15 g
Agua csp		1000 ml	1000 ml
Aumento de peso		5 %	5%

Tabla 4.5: Formulaciones del recubrimiento representativas de la serie experimental 10.

4.4.1.1 Metodología

Para desarrollar la formulación mediante una granulación por vía húmeda acuosa se establece la siguiente pauta de elaboración que es la misma para todas las formulaciones de esta serie experimental:

4.4.1.1.1 Elaboración del núcleo

- Pesada de las materias primas: Estrógenos conjugados (principio activo) y Celulosa microcristalina 101 (diluyente).
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 15 minutos.
- Preparación de la solución aglutinante: solución de Polivinilpirrolidona (PVP K30) en agua.
- Fase de amasado utilizando la amasadora doble sigma durante 20 minutos.
- Fase de granulación húmeda del amasado mediante la granuladora de húmedos provista de un tamiz de 2 mm de luz.

- Fase de secado en estufa a 40 °C durante 24 horas.
- Fase de granulación seca mediante granuladora oscilante provista de un tamiz de luz 1 mm.
- Pesada del resto de componentes: Celulosa microcristalina (Avicel 102), Hipromelosa, Sílice coloidal, talco y estearato.
- Fase de tamización de los componentes por tamiz nº30 ASTM (0.6 mm).
- Adición de los componentes extragranulares.
- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.
- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos bicóncavos de 8 mm de diámetro y un módulo de control de la fuerza ejercida.

4.4.1.1.2 Recubrimiento de los núcleos

- Pesada de los componentes.
- Elaboración de la dispersión de recubrimiento bajo agitación de ancla: trietilcitrate, etilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.
- Mezclar el dióxido de titanio y el colorante en un mortero y molturar en un molinillo.
- Añadir la mezcla colorante sobre la dispersión anterior.
- Tamizar la dispersión por un tamiz de luz 0.1 mm.
- Recubrimiento en el bombo de recubrir. Las condiciones del recubrimiento son las siguientes:
 - Temperatura del aire de entrada: 60-65 °C
 - Temperatura del aire de salida: 45-47 °C
 - Velocidad del bombo: 5 rpm
 - Velocidad de la bomba peristáltica: 12-13 rpm
 - Presión del aire de pulverización: 2 bars
 - Pulverización: Continua
 - Aumento de peso: 5%

4.4.1.2 Resultados

Para la evaluación de las características galénicas de los granulados y los comprimidos obtenidos se aplican los métodos descritos en la metodología y así determinar la idoneidad de las formulaciones. En las siguientes tablas de la 4.6 a 4.11 se muestran los resultados obtenidos para las formulaciones de la serie 10.

Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración

4.4.1.2.1 Formulación 10

Controles galénicos de los comprimidos											Media	CV (%)
Uniformidad de masa (mg)	196.4	197.5	201.3	199.9	197.0	202.1	201.0	202.6	201.5	198.4	199.8 mg	1.12
	200.4	197.7	196.8	202.2	202.3	202.1	196.1	201.6	199.1	199.6		
Dureza (N)	89.8	84.5	86.7	81.7	81.9	80.5	86.0	96.1	94.5	92.5	87.4 N	6.36
Valoración (%)	Estrona sulfato sódico (%)										103.41%	1.80
	Equilina sulfato sódico (%)										102.60%	1.50
Uniformidad de contenido (%)	97.73	104.14	100.15	96.10	104.61	99.32	99.62	102.02	95.49	97.09	99.63%	3.19
Friabilidad (%)											0.35%	
Capacidad flujo											2.4 s	6.89
Angulo reposo											27°	5.09
Índice de Hausner											1.10	
Índice de Carr's o compresibilidad											11%	

Tabla 4.6: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 10.

Ensayo de velocidad de disolución de los comprimidos (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media (%)	CV (%)
2 horas	98.66	100.07	99.01	97.51	97.56	96.03	98.14	1.44
5 horas	96.88	95.45	100.90	95.39	100.48	97.41	97.75	2.47
8 horas	96.87	95.67	100.75	97.11	95.86	97.09	97.23	1.89

Tabla 4.7: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución de la formulación 10.

4.4.1.2.2 Formulación 11

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV (%)
Uniformidad de masa (mg)	195.4	204.8	202.6	199.9	202.8	199.9	195.3	205.7	198.5	200.7	200.9 mg	1.79
	202.5	198.0	195.1	205.8	200.6	205.6	201.5	199.0	198.1	205.7		
Dureza (N)	86.0	89.8	87.7	97.7	88.4	88.8	90.6	82.4	89.6	89.3	89.0 N	4.33
Valoración (%)	Estrona sulfato sódico (%)										99.26%	2.05
	Equilina sulfato sódico (%)										103.90%	1.85
Uniformidad de contenido (%)	101.58	98.70	97.05	102.30	101.80	102.05	101.20	98.35	99.15	101.81	100.40	1.88
Friabilidad (%)											0.48%	
Capacidad flujo											3.1 s	4.20%
Angulo reposo											26°	7.05%
Índice de Hausner											1.12	
Índice de Carr's o compresibilidad											12%	

Tabla 4.8: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 11.

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
213.8	208.4	208.5	213.2	213.9	210.7	210.1	206.1	207.4	213.2	210.0	1.18
210.9	206.4	208.8	206.7	210.2	210.2	213.2	210.3	208.3	210.1		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	78.0	79.6	78.2	83.8	84.6	80.9	80.9		3.47		
5 horas	98.1	98.3	99.5	91.9	96.0	91.0	95.8		3.74		
8 horas	102.7	98.1	99.6	101.5	97.3	97.9	99.5		2.19		

Tabla 4.9: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 11.

4.4.1.2.3 Formulación 12

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV (%)
Uniformidad de masa (mg)	201.4	198.1	201.2	198.6	200.9	196.3	196.9	200.5	197.7	202.9	200.3 mg	1.17
	203.0	203.6	202.0	199.1	201.2	201.8	196.5	201.4	199.3	203.6		
Dureza (N)	83.4	89.2	90.1	95.5	82.2	84.6	97.9	86.3	85.0	89.2	88.3 N	5.83
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico (%)										96.35%	1.82
	Equilina sulfato sódico (%)										98.51%	2.05
Uniformidad de contenido (%)	97.49	95.27	100.95	94.87	94.65	95.88	100.17	97.17	101.45	95.11	97.30%	2.71
Friabilidad (%)											0.65%	
Capacidad flujo (s)											3.7 s	6.05
Angulo reposo											27°	5.50
Índice de Hausner											1.13	
Index de Carr's o compresibilidad											14%	

Tabla 4.10: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación12.

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
212.4	211.0	209.3	205.6	212.2	206.9	213.1	212.9	205.1	208.7	208.9	1.45
211.6	211.5	207.0	204.0	212.2	206.7	208.9	204.5	208.2	206.1		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	57.66	55.43	52.04	54.78	51.13	49.45	53.04		3.19		
5 horas	66.01	70.80	68.57	68.65	66.34	65.16	67.76		3.13		
8 horas	76.81	80.50	76.50	73.33	80.38	74.69	77.51		3.80		

Tabla 4.11: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 12.

4.4.1.3 Discusión

Las características reológicas de los granulados obtenidos son buenas con una capacidad de flujo inferior a 4 segundos. En relación a los ensayos de ángulo de reposo, Índices de Carr's y Hausner según el criterio de la Farmacopea Europea (99) las formulaciones tienen un flujo excelente o bueno. El proceso de compresión de las formulaciones de esta serie experimental muestra una variabilidad correcta en el peso y la dureza de los comprimidos. Durante el proceso de compresión se controla la fuerza realizada por los punzones y los comprimidos cuya fuerza realizada se encuentra fuera del intervalo especificado ($\pm 7.5\%$) son rechazados automáticamente. En el caso de las formulaciones de esta serie experimental el porcentaje de rechazo es inferior al 1%, valor usual y correcto para el proceso de compresión indicando que el llenado de las matrices es uniforme.

El perfil de disolución de la formulación 10 es demasiado rápido y no cumple las especificaciones. En la formulación 11 se ha aumentado en 10 mg el Methocel E5 premium y se ha formulado un recubrimiento con propiedades insolubles con la intención de disminuir la velocidad de disolución pero la formulación sigue siendo demasiado rápida. Para la formulación 12 se aumenta 5 mg de Methocel E5 premium y se ha realizado la misma cubierta que la formulación 11. En este caso se observa un perfil de disolución que a las primeras horas es demasiado rápido pero que a las 8 horas no llega a cumplir el límite establecido. Se ha observado una variación del perfil de disolución muy evidente frente a la pequeña variación en el contenido de Methocel E5 premium. Los comprimidos de la serie experimental 10 cumplen con las especificaciones excepto con el perfil de disolución. Por ello se decide abandonar esta serie experimental.

4.4.2 Formulaciones de la Serie 20

En esta serie se sustituye el Methocel E5 premium por Methocel K4M y se realizan cambios en la formulación del recubrimiento. Se cambia el proceso de elaboración de los comprimidos a una compresión directa evitando así someter a las formulaciones al calor y favorecer la disgregación del comprimido y así aumentar la velocidad de disolución. Se deberá tener especial atención en la homogeneidad de las mezclas. Las formulaciones más representativas de esta serie experimental se muestran en las tablas 4.12 y 4.13.

Componentes	FORMULACIONES		
	20	21	22
Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg	0.625 mg	0.625 mg
Hipromelosa (Methocel K4M)	24.00 mg	30.00 mg	37.00 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH 101)	70.00 mg	72.69 mg	72.69 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH 102)	85.09 mg	77.00 mg	70.00 mg
Silicie coloidal (Aerosil 200)	0.40 mg	0.20 mg	0.20 mg
Talco	16.00 mg	16.00 mg	16.00 mg
Laurilsulfato sódico	0.40 mg		
Estearato de Magnesio	3.00 mg	3.00 mg	3.00 mg
Peso comprimido	200 mg	200 mg	200 mg

Tabla 4.12: Formulaciones de los núcleos más representativas de la serie experimental 20.

Componentes	Formulación del recubrimiento					
	20			21		22
	20/1	20/2	20/3	21/1	21/2	
Polímero ácido metacrílico (Eudragit S)	120 g	120 g	120 g			
Etilcelulosa (Aquacoat ECD 30)				300 g	300 g	150 g
Hidroxipropilmetilcelulosa (Pharmacoat 606)				60 g	60 g	150 g
Trietilcitrate	60 g	60 g	60 g	30 g	30 g	30 g
Dioxido de titanio	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Rojo Sicopharm	15 g	15 g	15 g	15 g	15 g	15 g
Amoniaco 25%	4.15 g	4.15 g	4.15 g			
Agua csp	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Aumento de peso	15 %	10 %	5 %	6.5 %	5 %	5 %

Tabla 4.13: Formulaciones del recubrimiento que corresponden a la serie experimental 20.

4.4.2.1 Metodología

La técnica de elaboración se plantea mediante una compresión directa, ya que la proporción de principio activo es baja y el peso del comprimido es alto. Al ser baja la proporción de principio activo se mantendrá una especial vigilancia en el proceso de mezclado para asegurar la uniformidad de contenido de las formulaciones de la serie experimental. La técnica de elaboración de las formulaciones de la serie 20 es la siguiente:

4.4.2.1.1 Elaboración del núcleo

- Pesada de las materias primas: Estrógenos conjugados (principio activo) y Celulosa microcristalina 101.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)

- Mezclado por diluciones progresivas del principio activo por sucesivas tamizaciones con la celulosa microcristalina (Avicel pH101).
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 15 minutos.
- Pesada del resto de componentes.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Adición de los componentes a la mezcla del principio activo.
- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.
- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos biconcavos de 8 mm de diámetro y un módulo de control de la fuerza aplicada.

4.4.2.1.2 Recubrimiento de los núcleos

- Pesada de los componentes.
- Elaboración de la dispersión de recubrimiento bajo agitación de ancla: trietilcitrate, Eudragit S o etilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.
- Mezclar el dióxido de titanio y el colorante en un mortero y molturar en un molinillo. Añadir la mezcla colorante sobre la dispersión anterior.
- Tamizar la dispersión por un tamiz de luz 0.1 mm. Recubrimiento en el bombo de recubrir. Las condiciones del recubrimiento son las siguientes:
 - Temperatura del aire de entrada: 60-65 °C
 - Temperatura del aire de salida: 45-47 °C
 - Velocidad del bombo: 5 rpm
 - Velocidad de la bomba peristáltica: 12-13 rpm
 - Presión del aire de pulverización: 2 bars
 - Aumento de peso: variable

4.4.2.2 Resultados

Para la evaluación de las características galénicas de las mezclas de polvos y los comprimidos obtenidos se aplican los métodos descritos en la metodología y así determinar la idoneidad de las formulaciones.

En las siguientes tablas de la 4.14 a la 4.23 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de las formulaciones de la serie 20.

4.4.2.2.1 Formulación 20

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	205.6	199.3	205.5	206.9	204.4	196.9	197.4	200.7	200.9	198.0	201.8	1.79
	196.4	206.0	198.6	203.5	204.0	199.7	197.1	205.4	204.6	204.7		
Dureza (N)	97.0	96.4	82.9	82.1	92.4	85.6	82.4	96.6	84.6	83.5	88.4	7.33
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico Equilina sulfato sódico										99.57%	1.79
											100.94%	2.01
Uniformidad de contenido (%)	95.09	101.32	96.01	95.91	102.33	94.46	98.20	100.25	102.71	94.31	98.06	3.40
Friabilidad (%)											0.33%	
Capacidad flujo (s)											∞	
Angulo reposo											43	5.32
Índice de Hausner											1.36	
Índice de Carr's o compresibilidad											29%	

Tabla 4.14: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 20.

Formulación 20/1

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
229.9	225.2	236.4	232.7	237.0	226.0	230.1	235.2	237.3	220.6	229.9	2.24
229.6	225.8	235.3	223.5	234.4	231.3	221.2	227.6	232.0	227.8		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	4.56	4.46	1.37	2.52	1.54	0.62	2.51		5.23		
5 horas	31.56	26.05	29.83	28.26	27.96	29.83	28.92		6.60		
8 horas	53.71	40.69	50.18	43.65	48.39	43.81	46.74		10.39		

Tabla 4.15: resultados obtenidos en el ensayo uniformidad de masa y ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 20/1.

Formulación 20/2

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
220.4	217.2	219.5	224.9	220.3	221.4	224.2	221.0	222.3	224.2	220.8	1.34
223.2	224.8	219.9	220.9	215.3	218.2	217.1	223.7	221.3	215.7		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	14.66	17.26	11.78	15.06	15.34	14.72	14.80		4.89		
5 horas	43.42	47.48	48.00	44.76	49.88	43.66	46.20		5.70		
8 horas	58.56	60.34	59.89	63.38	56.70	62.31	60.20		4.04		

Tabla 4.16: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de masa para los comprimidos de la formulación 20/2.

Formulación 20/3

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
210.1	209.7	205.1	203.0	211.5	204.4	214.8	215.7	211.9	214.1	211.1	2.07
212.5	214.7	215.7	214.3	209.7	216.3	202.1	209.8	214.0	212.6		
Ensayo de velocidad de disolución											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	20.37	19.38	23.22	19.75	22.34	21.37	21.07		7.16		
5 horas	48.77	52.30	50.33	53.57	50.56	55.84	51.90		4.91		
8 horas	67.08	75.67	67.55	73.17	71.31	73.06	71.31		4.76		

Tabla 4.17: Resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de masa y el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 20/3.

4.4.2.2 Formulación 21

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	195.3	203.8	196.1	197.5	196.1	196.8	200.4	197.9	197.4	195.9	199.6 mg	1.72
	204.9	202.9	201.6	202.6	204.6	204.4	201.5	197.0	195.2	199.2		
Dureza (N)	85.6	89.0	80.5	82.9	86.7	90.1	85.6	89.6	85.4	82.1	85.7 N	3.77
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										95.06%	1.30
	Equilina sulfato sódico										94.22%	2.08
Uniformidad de contenido (%)	94.42	94.08	93.72	94.13	94.61	97.99	91.55	91.22	92.62	96.05	94.04%	2.14
Friabilidad (%)											0.56%	
Capacidad flujo (s)											∞	
Angulo reposo											45°	6.15
Índice de Hausner											1.41	
Índice de Carr's o compresibilidad											33%	

Tabla 4.18: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 21.

Formulación 21/1

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
211.2	209.7	208.1	217.4	210.0	209.5	209.7	216.0	207.4	216.5	212.5	2.11
212.2	207.6	215.9	207.5	216.9	212.5	211.2	220.9	221.6	208.5		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	27.55	31.59	30.89	33.44	26.11	31.95	30.26		9.31		
5 horas	48.12	47.22	43.72	43.96	40.71	44.50	44.71		5.97		
5 horas	53.45	57.41	51.37	51.47	57.36	54.37	54.24		4.97		

Tabla 4.19: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 21/1.

Formulación 21/2

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
217.9	215.0	203.6	203.1	214.0	205.2	210.7	216.7	204.7	204.1	209.61	2.26
214.0	212.4	205.7	210.5	207.1	211.0	211.1	213.5	203.6	208.5		
Ensayo de velocidad de disolución											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	53.28	60.76	57.45	52.32	54.44	57.02	55.88		5.61		
5 horas	89.52	86.98	83.44	78.91	88.48	79.45	84.46		5.43		
8 horas	93.81	93.79	99.86	101.09	95.50	99.14	97.20		3.32		

Tabla 4.20: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 21/2.

4.4.2.2.3 Formulación 22

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	208.7	195.1	205.0	205.2	209.0	202.8	205.1	199.4	201.7	195.9	202.02 mg	2.14
	200.0	195.5	202.4	201.6	202.6	199.0	206.0	202.9	207.1	195.5		
Dureza (N)	89.68	85.90	88.23	78.15	78.23	84.02	79.26	79.54	84.26	76.08	82.33N	5.71
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico (%)										101.57%	1.42
	Equilina sulfato sódico (%)										95.77%	1.05
Uniformidad de contenido (%)	95.11	101.79	99.97	101.86	98.38	100.35	95.52	100.37	95.08	101.13	98.96%	2.78
Friabilidad (%)											0.74%	
Capacidad flujo (s)											∞	
Ángulo reposo											46°	4.25
Índice de Hausner											1.45	
Índice de Carr's o compresibilidad											37%	

Tabla 4.21: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 22.

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
216.5	212.9	214.8	212.5	205.4	213.1	215.0	209.9	202.5	218.1	211.9	2.16
217.2	206.7	211.7	212.1	218.5	207.9	217.4	209.8	209.1	207.0		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	47.34	52.34	47.23	53.22	48.43	49.11	49.61		5.17		
5 horas	64.00	67.88	62.36	66.87	69.12	62.37	65.43		4.46		
8 horas	90.56	88.04	93.80	87.29	93.55	92.77	91.00		3.12		

Tabla 4.22: Resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de masa y en el ensayo de disolución y para los comprimidos de la formulación 22.

4.4.2.3 Discusión

Las características reológicas de las mezclas de polvos de la serie experimental 20 no son buenas. Tienen una capacidad de flujo nula y los índices Carr's y Hausner indican que las formulaciones tienen unas características de flujo entre mediocre y muy mediocre según la clasificación de Farmacopea Europea (99). La variabilidad del peso y dureza es correcta. El porcentaje de rechazo que registra el módulo de control de la compresión se encuentra por encima del 15% lo que indica que el llenado de las matrices es irregular.

La formulación 20/1 con un recubrimiento igual al 15% del peso del comprimido tiene un velocidad de disolución demasiado lenta con un porcentaje disuelto a las ocho horas entre 40 y 50% y por lo tanto no cumple con las especificaciones en cuanto al perfil de disolución. En la formulación 20/2 se disminuye el recubrimiento al 10%, con lo que el perfil se ha hecho más rápido llegando a liberar a las ocho horas alrededor del 60% del principio activo pero sigue sin cumplir las especificaciones del perfil de disolución. En la formulación 20/3 se disminuye hasta el 5% y sigue siendo demasiado lento; llegando a liberar a las ocho horas alrededor del 70% del principio activo y no cumpliendo con el perfil de disolución. En la formulación 21 se ha cambiado el tipo de recubrimiento manteniendo como excipiente para formar la matriz hidrófila al Methocel K4m. La formulación 21/1 tiene un aumento del recubrimiento del 6.5% y da lugar a una formulación que se disuelve a las 2 horas en un porcentaje alrededor de 30% pero en los siguientes tiempos la velocidad de disolución se ralentiza y no cumple con la especificación de disolución. En la formulación 21/2 se disminuye el recubrimiento al 5% dando lugar a una formulación que cumple la especificación de velocidad de disolución en los tiempos de 5 y 8 horas pero el porcentaje a las dos horas se encuentra por encima de la especificación. Se observa una gran variación en el perfil de disolución por pequeñas variaciones del porcentaje del recubrimiento. En la formulación 22 se modifica la composición del recubrimiento, dando a lugar a un perfil de disolución que es demasiado rápido a las dos horas y no llega al límite de las 5 horas.

Las formulaciones de la serie experimental 20 no cumplen el perfil de disolución especificado y poseen unas características reológicas deficientes. Por ello se abandona la serie experimental.

4.4.3 Formulaciones de la serie experimental 30

En la serie experimental 30 se sigue utilizando la hipromelosa pero en el mercado existen diferentes marcas comerciales que proporcionan diferentes viscosidades. Cuanto más viscosidad proporciona más retraso se consigue en la velocidad de disolución. Se inicia la investigación con Metolose 100000 SR. Se formulará un núcleo que cumpla las especificaciones el cual se recubrirá con una cubierta que afecte lo mínimo posible al perfil de disolución. La tabla 24 muestra los componentes de las formulaciones de la serie experimental 4.23.

Componentes	FORMULACIONES		
	30	31	32
Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg	0.625 mg	0.625 mg
Lactosa monohidrato	137.39 mg	152.39 mg	147.39 mg
Hipromelosa (Metolose 100000 SR)	60 mg	45 mg	50 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg	1.5 mg	1.5 mg
Peso comprimido	200 mg	200 mg	200 mg

Tabla 4.23: Formulaciones de la serie experimental 30

4.4.3.1 Metodología

La técnica de elaboración consiste en una compresión directa. La pauta general para la fabricación de las formulaciones de la serie 30 es la siguiente:

4.4.3.1.1 Elaboración del núcleo

- Pesada de las materias primas: Estrógenos conjugados (principio activo) y lactosa monohidrato (Tablettosa 80).
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Mezclado en diluciones progresivas del principio activo por sucesivas tamizaciones con la lactosa monohidrato.
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 15 minutos.
- Pesada del resto de componentes.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Adición de los componentes a la mezcla del principio activo.
- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.

- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos bicóncavos de 8 mm de diámetro y un módulo de control de la fuerza aplicada.

Los comprimidos no se recubren con el fin de conocer si por sí solos cumplen con el objetivo deseado. Si así fuera, se recubriría con una solución gastrosoluble que no afectaría su comportamiento.

4.4.3.2 Resultados

A partir de los comprimidos obtenidos se realiza el estudio de sus características galénicas para determinar la idoneidad de las formulaciones, los resultados obtenidos se muestran de la tabla 4.24 a la 4.29.

4.4.3.2.1 Formulación 30

Controles sobre los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	202.1	196.4	207.8	208.2	204.8	208.3	207.0	202.8	203.0	207.3	203.59 mg	2.13
	207.7	199.3	202.1	198.7	208.9	195.4	200.6	205.3	207.8	198.2		
Dureza (N)	85.07	82.0	83.8	96.7	87.1	88.4	80.7	91.1	85.1	90.6	87.0 N	5.53
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										106.87%	2.25
	Equilina sulfato sódico										98.04%	1.92
Uniformidad de contenido (%)	103.22	102.38	106.86	104.91	108.49	102.74	102.77	107.72	103.23	104.67	104.70%	2.15
Friabilidad (%)											0.46%	
Capacidad flujo (s)											5.4 s	3.41
Angulo reposo											43°	2.49
Índice de Hausner											1.34	
Índice de Carr's o compresibilidad											27%	

Tabla 4.24: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 30.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	31.44	34.40	31.18	30.34	37.44	31.44	32.71	8.25
5 horas	57.17	62.30	57.26	56.62	63.22	62.68	59.88	5.26
8 horas	74.19	80.21	75.08	74.25	77.56	78.09	76.56	3.19

Tabla 4.25: Resultados obtenidos en el ensayo uniformidad de masa y en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 30.

4.4.3.2.2 Formulación 31

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	205.8	204.8	208.1	207.0	196.4	206.8	199.4	205.8	200.0	196.7	201.5 mg	2.16
	205.4	198.2	200.7	200.3	197.3	195.7	207.7	199.9	196.4	198.5		
Dureza (N)	85.0	82.0	83.8	96.7	87.1	88.4	80.7	91.1	85.1	90.6	87.0 N	5.53
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										105.03%	1.78
	Equilina sulfato sódico										102.44%	1.41
Uniformidad de contenido (%)	103.64	106.86	99.47	103.47	102.99	107.08	107.16	107.54	105.45	106.44	105.01%	2.48
Friabilidad (%)											0.66%	
Capacidad flujo (s)											4.3 s	4.30
Angulo reposo											41°	3.85
Índice de Hausner											1.30	
Índice de Carr's o compresibilidad											23%	

Tabla 4.26: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 31.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	50.35	48.37	44.30	46.70	41.89	51.11	47.12	7.56
5 horas	79.84	78.45	75.33	77.34	78.89	80.87	78.45	2.48
8 horas	94.31	92.65	89.65	90.55	93.32	95.66	92.69	2.44

Tabla 4.27: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 31.

4.4.3.2.3 Formulación 32

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	207.7	203.0	208.1	195.1	195.5	200.7	203.4	202.1	201.0	201.3	201.78 mg	2.09
	198.5	205.6	206.6	207.5	204.7	195.6	196.9	198.8	198.9	204.2		
Dureza (N)	88.4	90.9	95.1	89.5	97.5	88.7	89.5	85.9	86.0	88.7	90.0 N	4.11
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										101.27%	2.09
	Equilina sulfato sódico										97.88%	1.89
Uniformidad de contenido (%)	97.10	100.17	97.05	95.66	98.44	96.99	99.75	99.48	97.87	96.06	97.86%	1.60
Friabilidad (%)											0.52%	
Capacidad flujo (s)											5.0 s	4.52
Angulo reposo											42°	3.02
Índice de Hausner											1.32	
Índice de Carr's o compresibilidad											25%	

Tabla 4.28: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 32.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	43.55	43.05	42.85	44.34	39.09	43.40	43.55	4.33
5 horas	73.68	69.89	73.25	75.68	69.48	72.99	73.68	3.28
8 horas	90.75	87.31	90.50	91.13	87.37	90.22	90.75	1.94

Tabla 4.29: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 32.

4.4.3.3 Discusión

Las características reológicas de las mezclas de polvos de la serie experimental 30 son buenas. Tienen una capacidad de flujo entre 4 y 5 y los índices Carr's y Hausner indican que las formulaciones tienen unas características de flujo entre pasable y mediocre según la clasificación de Farmacopea Europea (99). La variabilidad del peso y dureza es correcta. El porcentaje de rechazo que registra el módulo de control de la compresión se encuentra alrededor de 10% lo que indica que el llenado de las matrices es irregular.

El perfil de disolución de la formulación 3 es demasiado lento en los dos últimos tiempos: 5 horas y 8 horas. En la formulación 31 se disminuye en 15 mg la Metolosa 100000SR y el perfil de disolución cumple con la especificación pero a las dos horas el porcentaje disuelto está justo en el límite e incluso hay 2 comprimidos que sobrepasan el límite. En la formulación 32 se aumenta en 5 mg más la Metolosa 100000SR y el perfil de disolución cumple la especificación.

Las características reológicas de las mezclas de polvos no es adecuada y por otro lado el uso de la Metolosa 100000SR da lugar a dificultades en la realización del ensayo de riqueza y uniformidad de contenido de los comprimidos. Por ambos motivos se abandona la serie experimental 30.

4.4.4 Formulaciones de la serie 40

En esta serie se sustituye la Metolosa 100000SR por la Metolosa 4000SR que disminuirá la viscosidad de la muestra en el ensayo de uniformidad y dará a un perfil de disolución más rápido. Los comprimidos no se recubren con el fin de conocer si por sí solos cumplen con el objetivo deseado. Si así fuera, se recubriría con una solución gastrosoluble que no afectaría su comportamiento. Las formulaciones más representativas de esta serie experimental se presentan en la tabla 4.30.

Componentes	FORMULACIONES		
	40	41	42
Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg	0.625 mg	0.625 mg
Lactosa monohidrato	137.39 mg	152.39 mg	111.87 mg
Hipromelosa (Metolosa 4000 SR)	60 mg	45 mg	45 mg
Celulosa microcristalina (Avicel pH 102)	---	---	40.41 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg	1.5 mg	1.5 mg
Peso comprimido	200 mg	200 mg	200 mg

Tabla 4.30: Componentes de las formulaciones de la serie 40

4.4.4.1 Metodología

La técnica de elaboración consiste en una compresión directa. La pauta general para la fabricación de las formulaciones de la serie experimental 40 es la siguiente:

4.4.4.1.1 Elaboración del núcleo

- Pesada de las materias primas.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Mezclado diluciones progresivas del principio activo por sucesivas tamizaciones con la lactosa monohidrato.
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 15 minutos.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Adición de los componentes a la mezcla del principio activo.
- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.
- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos bicóncavos de 8 mm de diámetro y un módulo de control de la fuerza ejercida.

Los comprimidos no se recubren con el fin de conocer si por sí solos cumplen con el objetivo deseado. Si así fuera, se recubriría con una solución gastrosoluble que no afectaría su comportamiento

4.4.4.2 Resultados

A partir de los comprimidos obtenidos se realiza el estudio de sus características galénicas para determinar la idoneidad de las formulaciones. Los resultados obtenidos

en la evaluación de las formulaciones de la serie 40 se muestran en las tablas de la 4.31 a la 4.36.

4.4.4.2.1 Formulación 40

Controles sobre los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	197.2	204.1	205.2	196.5	206.0	195.6	207.6	197.2	200.7	198.3	201.83 mg	1.91
	199.1	203.9	204.5	199.4	206.9	205.5	198.6	204.9	204.4	201.2		
Dureza (N)	90.1	95.1	82.4	90.4	98.0	84.7	97.8	92.6	93.8	83.3	90.8 N	6.32
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										95.18%	1.42
	Equilina sulfato sódico										96.34%	1.05
Uniformidad de contenido (%)	94.66	95.85	90.70	96.23	97.34	95.44	97.22	98.00	96.77	97.43	95.96%	2.22
Friabilidad (%)											0.75%	
Capacidad flujo (s)											5.0 s	5.60
Angulo reposo											40°	3.29
Índice de Hausner											1.29	
Índice de Carr's o compresibilidad											26%	

Tabla 4.31: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 40.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV
2 horas	48.08	44.66	43.55	45.29	44.23	46.55	45,39	3,67
5 horas	83,21	75,60	72,33	73,23	75,68	76,41	76,08	5,04
8 horas	102,33	94.79	92.27	94,56	95,44	93,67	95,51	3,68

Tabla 4.32: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 40.

4.4.4.2.2 Formulación 41

Controles sobre los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	199.5	206.9	201.3	200.6	197.0	202.2	202.9	201.6	197.4	200.6	202.2 mg	2.16
	195.6	205.3	202.0	207.3	208.6	204.8	200.8	196.3	208.5	205.5		
Dureza (N)	96.7	82.5	86.9	84.2	89.4	93.3	81.8	91.0	88.2	90.1	88.4N	5.36
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										100.75%	1.05
	Equilina sulfato sódico										97.16%	1.82
Uniformidad de contenido (%)	94.45	92.33	91.16	93.18	96.34	95.87	94.15	95.32	92.45	97.54	94.28%	2.15
Friabilidad (%)											0.70%	
Capacidad flujo (s)											4.6 s	4.63
Angulo reposo											38°	3.25
Índice de Hausner											1.26	
Índice de Carr's o compresibilidad											23%	

Tabla 4.33: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 41.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	43.54	43.09	45.40	43.55	43.54	46.61	44.29	3.15
5 horas	74.64	74.05	76.30	75.00	74.56	77.11	75.28	1.56
8 horas	92.38	91.44	93.01	92.29	92.67	95.23	92.84	1.38

Tabla 4.34: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 41.

4.4.4.2.3 Formulación 42

Controles sobre los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	199.3	200.2	194.7	195.7	201.3	199.5	196.1	199.5	195.4	200.8	198.9 mg	1.31
	201.7	203.8	196.8	200.7	203.3	196.8	197.5	199.7	197.4	197.8		
Dureza (N)	96.0	94.6	81.0	94.2	87.4	82.3	86.2	91.3	88.1	86.4	88.8 N	5.80
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico Equilina sulfato sódico										104.67%	2.11
											101.11%	1.89
Uniformidad de contenido (%)	106.72	106.13	103.68	103.88	101.83	104.44	105.79	108.27	102.92	101.77	104.54%	2.06
Friabilidad (%)											0.63%	
Capacidad flujo (s)											3.8 s	4.69
Angulo reposo											35°	3.49
Índice de Hausner											1.20	
Índice de Carr's o compresibilidad											20%	

Tabla 4.35: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 42.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	49.17	51.00	48.82	52.44	53.01	52.03	51.08	3.42
5 horas	80.88	82.49	81.57	83.76	78.31	80.09	81.18	2.34
8 horas	96.50	96.04	94.55	93.56	96.44	96.62	95.62	1.32

Tabla 4.36: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 42.

4.4.4.3 Discusión

Las características reológicas de las mezclas de polvos de la serie experimental 40 han mejorado. La formulación 40 y 41 tienen una capacidad de flujo de alrededor de 5 segundos y los índices Carr's i Hausner indican que las formulaciones tienen unas características de flujo entre mediocre y pasable según la clasificación de Farmacopea Europea (99). Mientras que la formulación 42 tiene una capacidad de flujo de 3.8 segundos y los índices Carr's y Hausner indican que las formulaciones tiene una

característica de flujo bastante buena según la clasificación de Farmacopea Europea (99). La variabilidad del peso y dureza es correcta. El porcentaje de rechazo que registra el módulo de control de la compresión para las formulaciones 40 y 41 se encuentra alrededor de 8% mientras que el porcentaje de rechazo para la formulación 42 baja hasta el 5%. Las tres formulaciones representativas de esta serie cumplen las especificaciones del perfil de disolución. En el ensayo de disolución de la formulación 40 a las cinco horas se encuentra un porcentaje disuelto cerca del límite y con el posterior recubrimiento podría retrasarse y encontrarse fuera de las especificaciones. Las Formulaciones 41 y 42 cumplen las especificaciones y la inclusión de la celulosa microcristalina ha mejorado las características reológicas de la formulación 42. Se plantea seguir investigando tomando como punto de partida esta serie para mejorar las características y ajustar mejor la velocidad de disolución a la especificación.

4.4.5 Formulaciones de la Serie 50

En la serie 50 se modifica la formulación para mejorar las características reológicas, se sustituye el excipiente mayoritario o se cambia la técnica de elaboración a una granulación por vía húmeda. Los comprimidos no se recubren con el fin de conocer si por sí solos cumplen con el objetivo deseado. Si así fuera, se recubriría con una solución gastrosoluble que no afectaría su comportamiento. Las formulaciones más representativas de esta serie experimental se muestran en la tabla 4.37.

Componentes	FORMULACIONES		
	50	51	52
Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg	0.625 mg	0.625 mg
Lactosa anhidra (Pharmatose DCL21)	111.87 mg		
Hipromelosa (Metolosa 4000 SR)	45 mg	45 mg	45 mg
Fosfato bicalcico (Emcompress)		111.98 mg	
Celulosa microcristalina (Avicel pH 101)	40.41 mg	40.41 mg	68.82 mg
Polivinilpirrolidona (PVP K30)			14 mg
Lactosa monohidrato (Tabletosa 80)			43.00 mg
Almidon maíz			23.67 mg
Glicolato sódico de almidón (Primojel)			2.5 mg
Silice coloidal (Cabosil)			0.4 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg	1.5 mg	1.5 mg
Peso comprimido	200 mg	200 mg	200 mg

Tabla 4.37: Formulaciones representativas de la serie experimental 50.

4.4.5.1 Metodología

La técnica de elaboración consiste en una compresión directa o una granulación por vía húmeda para conseguir mejorar las características reológicas. La pauta general para la fabricación de las formulaciones de la serie experimental 50 es la siguiente:

4.4.5.1.1 Elaboración del núcleo por compresión directa

- Pesada de las materias primas.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Mezclado por diluciones sucesivas del principio activo por sucesivas tamizaciones con el diluyente (lactosa anhidra o fosfato bicálcico (Emcompress)).
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 15 minutos.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Adición de los componentes a la mezcla del principio activo.
- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.
- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos bicóncavos de 8 mm de diámetro y módulo de control de la fuerza ejercida.

4.4.5.1.2 Elaboración del núcleo por compresión previa granulación húmeda

- Pesada de las materias primas: Celulosa microcristalina 101 y almidón de maíz.
- Tamización de las materias primas por un tamiz nº30 ASTM (0.6 mm)
- Mezclado de los componentes utilizando una mezcladora en V durante 5 minutos.
- Preparación de la solución aglutinante: solución de PVP K30 en agua y se disuelven los estrógenos conjugados.
- Fase de amasado utilizando la amasadora doble sigma durante 20 minutos.
- Fase de granulación húmeda del amasado mediante la granuladora de húmedos provista de un tamiz de 2 mm de luz.
- Fase de secado en estufa a 40 °C durante 24 horas.
- Fase de granulación seca mediante granuladora oscilante provista de un tamiz de luz 1 mm.
- Pesada del resto de componentes.
- Fase de tamización de los componentes por tamiz nº30 ASTM (0.6 mm).
- Adición de los componentes al granulado

- Fase de mezclado final utilizando la mezcladora en V durante 15 minutos.
- Compresión en máquina de comprimir rotatoria provista de punzones redondos bicóncavos de 8 mm de diámetro y módulo de control de la fuerza ejercida.

4.4.5.2 Resultados

A partir de los comprimidos obtenidos se realiza el estudio de sus características galénicas para determinar la idoneidad de las formulaciones. Los resultados obtenidos en la evaluación de las formulaciones se muestran en las tablas de la 4.38 a la 4.49.

4.4.5.2.1 Formulación 50

Controles sobre los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	198.0	207.5	196.3	208.4	196.0	204.6	202.0	207.8	207.8	206.6	202.17 mg	2.26
	197.5	201.7	195.9	200.3	206.7	206.3	197.3	203.4	202.3	197.4		
Dureza (N)	85.1	82.4	88.2	82.9	93.8	92.5	94.8	86.0	86.3	84.5	87.6 N	5.18
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										104.00%	1.92
	Equilina sulfato sódico										98.81%	1.85
Uniformidad de contenido (%)	104.72	102.08	105.69	107.85	104.04	103.52	105.85	108.12	103.12	103.69	104.87%	1.91
Friabilidad (%)											0.43%	
Capacidad flujo (s)											3.4 s	3.82
Angulo reposo											32°	3.15
Índice de Hausner											1.14	
Índice de Carr's o compresibilidad											14%	

Tabla 4.38: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 50.

Ensayo de velocidad de disolución								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV
2 horas	44.65	48.90	51.34	46.23	47.42	45.00	47.26	5.38
5 horas	79.31	84.56	86.49	84.34	85.23	84.98	84.15	2.96
8 horas	97.30	97.99	99.54	100.33	97.66	99.62	98.74	1.26

Tabla 4.39: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 50.

4.4.5.2.2 Formulación 51

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	198.6	204.3	204.7	200.4	200.0	199.3	199.6	208.3	206.3	199.1	202.53 mg	1.76
	207.2	202.3	204.8	198.1	206.1	201.5	204.4	208.0	197.0	200.6		
Dureza (N)	85.0	86.2	86.1	96.8	89.0	95.1	88.7	93.5	97.7	87.1	90.5N	5.28
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										106.12%	2.01
	Equilina sulfato sódico										108.02%	1.96
Uniformidad de contenido (%)	108.19	109.92	107.50	102.77	105.66	106.51	104.40	105.79	108.88	104.32	106.39%	2.10
Friabilidad (%)											0.63%	
Capacidad flujo (s)											3.2 s	2.40
Angulo reposo											29°	3.82
Índice de Hausner											1.14	
Índice de Carr's o compresibilidad											12%	

Tabla 4.40: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 51.

Ensayo de velocidad de disolución								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	38.72	41.09	43.45	42.88	40.00	43.23	41.56	4.67
5 horas	65.48	67.17	63.45	65.89	62.55	66.81	65.23	2.84
8 horas	80.96	82.87	79.12	80.44	81.56	84.15	81.52	2.19

Tabla 4.41: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 51.

4.4.5.2.3 Formulación 52

Controles galénicos de los núcleos											Media	CV(%)
Uniformidad de masa (mg)	207.8	205.3	196.6	208.9	204.0	205.2	205.2	200.7	195.3	197.3	200.65 mg	2.33
	196.4	195.2	198.7	198.2	199.2	195.5	197.5	199.5	197.9	208.6		
Dureza (N)	93.5	84.5	85.2	85.2	84.5	81.8	86.3	84.4	95.4	81.4	86.22N	5.35
Valoración(%)	Estrona sulfato sódico										103.82%	1.21
	Equilina sulfato sódico										101.30%	1.43
Uniformidad de contenido (%)	110.42	108.25	110.17	110.88	107.66	109.11	106.25	105.24	107.32	105.12	108.04%	1.92
Friabilidad (%)											0.52%	
Capacidad flujo (s)											2.1 s	2.21
Ángulo de reposo											24°	3.05
Índice de Hausner											1.10	
Índice de Carr's o compresibilidad											9%	

Tabla 4.42: Resultados obtenidos para los ensayos de uniformidad de masa, dureza, valoración, uniformidad de contenido, friabilidad, capacidad de flujo, ángulo de reposo, índice de Hausner e índice de Carr's o compresibilidad para la formulación 52.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	46.30	47.93	48.68	46.77	48.24	47.66	47.60	1.89
5 horas	76.93	79.21	82.54	77.86	80.11	77.92	79.10	2.56
8 horas	93.02	93.87	95.76	92.87	94.76	96.19	94.41	1.48

Tabla 4.43: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 52.

4.4.5.3 Discusión

Las características reológicas de las mezclas de polvos de la serie experimental 50 son adecuadas. Las formulaciones 50 y 51 tienen una capacidad de flujo alrededor de 3 segundos y los índices Carr's y Hausner indican que las formulaciones tienen unas características de flujo buenas según la clasificación de Farmacopea Europea (99). La formulación 52 tiene una capacidad de flujo de alrededor de 2 segundos y los índices Carr's y Hausner indican que la formulación tiene unas características de flujo excelentes según la clasificación de Farmacopea Europea (99). La variabilidad del peso y dureza es correcta. El porcentaje de rechazo que registra el módulo de control de la compresión se encuentra por debajo del 1% lo que indica que el llenado de las matrices es regular. En cuanto al ensayo de disolución, la formulación 50 se encuentra muy cerca de los límites superiores a las 2 horas y el resto de tiempos los resultados se encuentran alejados de los límites. La formulación 51 se encuentra alrededor del límite inferior a las 5 y 8 horas. La formulación 52 cumple con las especificaciones pero a las dos horas los resultados se encuentran muy cercanos al límite superior.

La formulaciones 50 y 52 cumplen con las especificaciones y, una vez recubiertos los comprimidos, la velocidad de disolución se retrasará suficiente para alejarse del límite superior de las dos horas. Se inicia el estudio del recubrimiento, optándose por realizar un recubrimiento soluble que no afecte el perfil de disolución y un recubrimiento orgánico insoluble que puede disminuir la velocidad de disolución (tabla 4.44).

4.4.5.4 Formulación del recubrimiento

Componentes	Formulación 50		Formulación 52	
	Recubrimiento soluble 50/1	Recubrimiento orgánico 50/2	Recubrimiento soluble 52/1	Recubrimiento orgánico 52/2
Etilcelulosa (Aqualon)		25 g		25 g
Aceite de ricino		47 g		47 g
Etanol 96% csp		1000 ml		1000 ml
Aumento de peso		2%		2%
Hidroxipropilmetilcelulosa (Pharmacoat 606)	88 g	88 g	88 g	88 g
Dióxido de titanio	20.5 g	20.5 g	20.5 g	20.5 g
Rojo sicopharm 30	17.5 g	17.5 g	17.5 g	17.5 g
Agua csp	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Aumento de peso	2%	2%	2%	2%

Tabla 4.44: Formulaciones del recubrimiento de la serie experimental 50

4.4.5.5 Metodología

La pauta para realizar el recubrimiento orgánico de los núcleos es la siguiente:

- Pesada de los componentes.
- Elaboración de la dispersión de recubrimiento bajo agitación de ancla: aceite de ricino y la etilcelulosa en etanol.
- Recubrimiento en el bombo de recubrir. Las condiciones del recubrimiento son las siguientes:
 - Temperatura del aire de entrada: 40-45 °C
 - Temperatura del aire de salida: 30-35 °C
 - Velocidad del bombo: 5 rpm
 - Velocidad de la bomba peristáltica: 20 rpm
 - Presión del aire de pulverización: 2 bars
 - Pulverización: Continua
 - Aumento de peso: 2%

La pauta para realizar el recubrimiento soluble de los núcleos es la siguiente:

- Pesada de los componentes.
- Incorporar la hidroxipropilmetilcelulosa en agua
- Mezclar el dióxido de titanio y el colorante en un mortero y molturar en un molinillo.
- Añadir la mezcla colorante sobre la dispersión anterior.
- Tamizar la dispersión por un tamiz de luz 0.1 mm.

- Recubrimiento en el bombo de recubrir. Las condiciones del recubrimiento son las siguientes:
 - Temperatura del aire de entrada: 60-65 °C
 - Temperatura del aire de salida: 45-47 °C
 - Velocidad del bombo: 5 rpm
 - Velocidad de la bomba peristáltica: 16-17 rpm
 - Presión del aire de pulverización: 2 bars
 - Pulverización: Continua
 - Aumento de peso: 2%

4.4.5.5.1 Resultados

Formulación 50/1

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV(%)
202.5	205.8	201.8	203.2	207.3	208.4	206.2	204.0	207.7	205.4	206.0	1.30
209.8	209.1	208.5	205.3	208.2	207.2	201.4	203.4	209.7	204.6		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV(%)		
2 horas	39.62	36.82	39.59	40.22	37.88	38.59	38.79		3.29		
5 horas	78.30	70.29	77.70	75.62	73.45	76.40	75.29		3.97		
8 horas	95.98	90.23	94.71	93.67	91.58	89.02	92.53		2.92		

Tabla 4.45: resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 50/1.

Formulación 50/2

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos con cubierta orgánica (mg)										Media	CV
206.0	208.0	203.4	208.0	200.4	207.6	203.9	203.0	204.8	202.7	205.0	1.36
203.8	202.6	209.1	209.8	202.4	203.2	203.3	202.4	209.6	205.4		
Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos con cubierta orgánica y de color (mg)										Media	CV(%)
214.7	206.0	213.8	205.0	212.8	205.2	212.9	203.7	214.8	208.3	209.1	2.17
209.0	204.9	214.7	204.0	203.5	210.7	203.4	213.8	206.0	214.8		
Ensayo de velocidad de disolución (%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)			
2 horas	31.24	39.13	32.03	38.65	35.70	36.07	35.47	9.23			
5 horas	72.01	74.99	74.75	75.05	70.61	77.01	74.07	3.14			
8 horas	89.95	93.28	95.78	89.05	92.06	90.11	91.71	2.75			

Tabla 4.46: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 50/2.

Formulación 52/1

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos (mg)										Media	CV
206.9	200.2	207.3	202.6	206.2	202.4	204.6	200.5	203.8	209.4	204.7	1.33
201.5	202.3	202.7	204.4	203.9	206.3	207.1	205.5	206.2	209.8		
Ensayo de velocidad de disolución(%)											
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media		CV		
2 horas	47.17	48.13	45.02	46.92	41.03	42.49	45.13		6.28		
5 horas	75.90	82.48	73.78	76.68	72.45	77.72	76.50		4.58		
8 horas	93.18	95.05	92.40	91.31	96.43	90.84	93.20		2.33		

Tabla 4.47: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución y uniformidad de de masa para los comprimidos de la formulación 52/1.

Formulación 52/2

Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos con cubierta orgánica (mg)										Media	CV
204.4	210.5	200.1	204.1	210.8	206.3	206.3	209.0	208.7	208.3	206.1	1.63
202.0	205.6	210.8	205.5	204.9	209.8	202.2	200.7	208.6	204.1		
Uniformidad de masa de los comprimidos recubiertos con cubierta orgánica y de color (mg)										Media	CV(%)
210.4	204.1	208.7	205.7	211.7	211.5	211.5	208.1	207.2	203.7	207.6	1.36
207.5	209.5	207.7	203.9	204.3	209.6	205.1	207.9	210.4	203.5		

Tabla 4.48: Resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de masa para los comprimidos de la formulación 52/2.

Ensayo de velocidad de disolución (%)								
Tiempo	1	2	3	4	5	6	Media	CV(%)
2 horas	28.79	29.81	30.54	33.19	31.22	28.43	30.33	5.76
5 horas	63.88	60.68	66.68	65.34	66.92	62.22	64.29	3.89
8 horas	86.58	81.07	87.43	85.68	87.23	84.78	85.46	2.77

Tabla 4.49: Resultados obtenidos en el ensayo de disolución para los comprimidos de la formulación 52/2.

4.4.5.6 Discusión

La uniformidad de masa de las formulaciones 50/1, 50/2, 52/1 y 52/2 es correcta indicando un proceso de recubrimiento adecuado. Las formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 cumplen con las especificaciones fijadas en el inicio del estudio. Se toman como formulaciones definitivas con las que se iniciará el estudio de estabilidad.

CAPÍTULO 5: PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR HPLC

5.1 INTRODUCCIÓN

La validación analítica se define como el proceso documentado a través del cual se establecen evidencias que proporcionen un alto grado de confianza de que un método analítico posee los requisitos suficientes para el uso propuesto y los seguirá teniendo si se mantienen los parámetros de trabajo (100). La validación de una metodología analítica está motivada no sólo para cumplir las normas sino para demostrar que el método analítico proporciona resultados seguros y fiables que puedan asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones de calidad exigidas (101).

Para llegar a evaluar una metodología analítica se debe estudiar diferentes parámetros que dependen del tipo de ensayo a validar. La validación de métodos ha recibido una considerable atención de la literatura farmacéutica como desde agencias reguladoras. La USP 29 (97) divide a los métodos analíticos en 4 categorías diferentes; para cada una de ellas define los parámetros que como mínimo deben ser analizados (tabla 5.1).

Parámetro	Categorías				
	Categoría 1	Categoría 2		Categoría 3	Categoría 4
		Cuantificación	Test límite		
Exactitud	X	X	*	*	
Precisión	X	X		X	
Selectividad	X	X	X	*	X
Límite detección			X	*	
Límite cuantificación		X		*	
Linealidad	X	X		*	
Intervalo	X	X	*	*	

Tabla 5.1: Parámetros a estudiar según la categoría del método analítico a validar. *según la naturaleza del test.

La categoría 1 corresponde a los métodos analíticos para la cuantificación de componentes mayoritarios tanto en materia prima como medicamentos. En la categoría 2 están incluidos los métodos destinados a determinar productos de degradación e impurezas en producto acabado y materia prima tanto para cuantificación o test límites. La categoría 3 incluye todos aquellos métodos destinados a realizar pruebas de comportamiento galénico. Por último la categoría 4 se refiere a los métodos de identificación.

Según las guías ICH (102,103) clasifican las metodicas analíticas en 3 categorías diferentes; para cada una de ellas define los parámetros mínimos que deben ser evaluados (tabla 5.2).

Parámetro		Tipos de ensayos			
		Identificación	Test de impurezas		Valoración • disolución • contenido
			Cuantificación	Test límite	
Exactitud			X		X
Precisión	Repetibilidad		X		X
	Precisión intermedia		X		X
Selectividad		X	X	X	X
Límite detección				X	
Límite cuantificación			X		
Linealidad			X		X
Intervalo			X		X

Tabla 5.2: Parámetros a estudiar según la categoría del método analítico a validar. *según la naturaleza del test.

Una primera categoría de ensayos de identificación, una segunda categoría de ensayos de impurezas que se encuentra dividido en ensayos de cuantificación y test límite y una tercera categoría de valoración tanto disolución como contenido.

En las diferentes farmacopeas (82,83,97) está descrito un método de cromatografía de gases con previa hidrólisis enzimática tanto para la materia prima como en producto acabado. En esta memoria se ha puesto a punto y validado un nuevo método analítico por HPLC para la determinación de estrógenos conjugados tanto en materia prima como en producto acabado además de la determinación de las impurezas. El método analítico se ha utilizado de manera rutinaria para los ensayos de la determinación de los estrógenos conjugados en el ensayo de contenido y uniformidad de contenido durante el desarrollo galénico, además de utilizarlo en el estudio de estabilidad.

Por lo que teniendo en cuenta lo descrito tanto en la USP 29 (97) como en las ICH (102,103) los parámetros que se han tenido en consideración para llevar a cabo la validación son los que se citan a continuación.

5.1.1 Idoneidad del sistema (system suitability)

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el mismo momento de utilización de un método, que el sistema es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. La idoneidad del sistema no es tan solo un parámetro de validación sino que es una comprobación que se debe realizar cada vez que se vaya a realizar la determinación, por lo tanto el test de idoneidad del sistema forma parte integrante del procedimiento.

Los parámetros para evaluar la idoneidad del ensayo se pueden dividir en tres categorías:

- Precisión
- Parámetros cromatográficos:
 - Factor de capacidad (k')
 - Números de platos teóricos (N)
 - Factor de asimetría
 - Resolución entre picos consecutivos
- Límites de detección y cuantificación

Como norma general una prueba de idoneidad de un sistema contendrá como mínimo parámetros pertenecientes a dos categorías diferentes (101).

5.1.2 Selectividad

La selectividad es la capacidad para discriminar inequívocamente el analito en presencia de componentes como excipientes, impurezas y productos de degradación que pueden estar presentes en la muestra.

En cromatografía líquida es una tarea difícil averiguar si los picos obtenidos en los cromatogramas son puros o son debidos a más de un componente. Mientras que en el pasado se averiguaba modificando la proporción de la fase móvil, el tipo de columna, etc., actualmente la existencia de detectores como UV/visible Diodo-array y espectrómetros de masas que evalúan el espectro durante la elución del pico nos permite conocer la pureza cromatográfica de cada pico llegando a detectar porcentajes de hasta 0.05% en impurezas (104,105).

5.1.3 Linealidad e intervalo

La linealidad de un método analítico consiste en la capacidad dentro de un intervalo de concentración de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

El intervalo de trabajo indica la concentración más alta y más baja de analito en la muestra dentro de los cuales se demuestra que el método analítico tiene suficiente precisión, exactitud y linealidad.

5.1.4 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia o grado de dispersión entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras de una mezcla homogénea. El objetivo de la precisión es conocer la variabilidad de los resultados individuales a consecuencia de los errores aleatorios inherentes a cualquier método. La precisión se puede considerar a diferentes niveles de estudios:

- Repetibilidad del sistema instrumental: Capacidad de un instrumento para reproducir sus propias medidas. El parámetro indica la variabilidad debida

únicamente al equipo utilizado. Se demuestra con inyecciones consecutivas de una misma muestra.

- Repetibilidad del sistema: El parámetro estudia la variabilidad de los resultados obtenidos con las lecturas de una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio hasta el final por el mismo instrumento y analista.
- Precisión intermedia: La precisión intermedia expresa las variaciones que se pueden producir dentro de un mismo laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

5.1.5 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar.

El límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito en la muestra que se puede cuantificar con adecuada precisión y exactitud.

La mayoría de software utilizado en la adquisición y proceso de los equipos de cromatografía líquida tienen la capacidad de calcular estos límites a partir de la altura, concentración y ruido de la línea base del cromatograma. Son valores teóricos que deben ser comprobados experimentalmente.

5.2 MATERIAL

a) Estándares

- Estrona, estándar Sigma-Aldrich. Lote 019H0775. Título: 99.9%
- Equilina, estándar Sigma-Aldrich. Lote 065K0958. Título: 98.0%
- 17 α -dihidroequilina, estándar USP. Lote I0C277. Título: 98.8%
- 17 β -dihidroequilina, estándar Organon. Lote CK0180K1A. Título: 99.2%
- 17 α -estradiol, estándar Sigma-Aldrich. Lote 066K4031. Título: 99.5%
- 17 β -estradiol, estándar Sigma-Aldrich. Lote 49H8801. Título: 100.1%
- 17 α -dihidroequilenina, estándar Organon. Lote GV1790K1. Título: 99.6%
- 17 β -dihidroequilenina, estándar Organon. Lote SA0136K1. Título: 99.9%
- Equilenina, estándar Organon. Lote SA0092K1B. Título: 97.4%
- Estrogenos conjugados, estándar secundario.

b) Disolventes

- Agua purificada
- Agua de calidad HPLC
- Metanol de calidad HPLC
- Acetonitrilo de calidad HPLC

c) Reactivos

- Etilparabeno, calidad análisis.
- Ácido clorhídrico concentrado, calidad análisis.
- Bicarbonato sódico, calidad análisis.
- Fluoximesterona

d) Material de laboratorio

- Matraces aforados
- Vasos de precipitados
- Varillas de vidrio
- Columna cromatográfica Kromasil 100RP C18, 20 cm x 0.46 cm, 5 µm
- Filtros de papel de celulosa Albet

e) Equipos

- Balanza analítica Metler Toledo tipo AB-135
- Estufa Heraeus Modelo T5028
- Equipo cromatográfico Waters 2690 con detector PDA 996.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Validación del método analítico para la valoración de la materia prima e impurezas

5.3.1.1 Descripción del método

5.3.1.1.1 Condiciones cromatograficas

El sistema cromatografico utilizado consiste en un Waters modelo 2695 provisto de inyector automático, horno para columnas y una bomba cuaternaria. El detector consiste en un espectrofotómetro ultravioleta del tipo PDA (photodiode array) que puede trabajar en un intervalo de longitudes de onda al mismo tiempo dando información sobre la pureza de los picos obtenidos. Para la separación de los

componentes se utiliza una columna de octadecilsilano de 20 cm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 micras de acero inoxidable (por ejemplo Kromasil 100 RP C18) que se mantiene a una temperatura de constante de 27 °C.

La fase móvil está formada por una mezcla de acetonitrilo y agua en la proporción 34:66 respectivamente. La mezcla se filtra y desgasifica a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm. La fase móvil se bombea a un flujo de 2 ml por minuto. El detector ultravioleta trabaja en el intervalo de longitudes de 200 a 300 nm, como longitud de valoración se fija a 210 nm.

5.3.1.1.2 Soluciones auxiliares

- Fase de dilución. Mezclar cantidades iguales de acetonitrilo y agua.
- Solución de HCl/ACN. Mezclar con precaución cantidades iguales de ácido clorhídrico concentrado y acetonitrilo.

5.3.1.1.3 Soluciones para la identificación individual

- Solución de Estrona. Pesar aproximadamente 23 mg exactamente de estrona estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de Equilina. Pesar aproximadamente 11 mg exactamente de equilina estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución de 17 α -dihidroequilina. Pesar aproximadamente 7 mg exactamente de 17 α -dihidroequilina estándar e introducir en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 β -dihidroequilina. Pesar 10 mg exactamente de 17- β -dihidroequilina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 α -estradiol. Pesar 10 mg exactamente 17 α -estradiol estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 5 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 α -dihidroequilenina. Pesar 14 mg exactamente de 17 α -dihidroequilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver

en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución de 17 β -dihidroequilenina. Pesar 14 mg exactamente de 17 β -dihidroequilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de 17 β -estradiol. Pesar 10 mg exactamente de 17 β -estradiol estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 2 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución de Equilenina. Pesar 11 mg exactamente de Equilenina estándar e introducir en un matraz aforado de 20 ml. Disolver en unos 15 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo (solución A). Tomar 4 ml de la solución anterior llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución de identificación del estándar interno. Pesar 25 mg de etilparabeno e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en unos 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. Tomar 1 ml de la solución anterior llevar a un tubo de 20 ml de capacidad. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

5.3.1.1.4 Soluciones de cuantificación

- Solución estándar interno. Pesar 25 mg de etilparabeno en un matraz de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta disolución completa.
- Solución estándar. Pesar exactamente 23 mg de estrona estándar, 11 mg de equilina estándar y 7 mg de 17 α -dihidroequilina estándar e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir las siguientes cantidades del resto de estrógenos: 2 ml de la solución A de 17 β -dihidroequilina, 5 ml de la solución A de 17 α -estradiol, 2 ml de la solución A de 17 α -dihidroequilenina, 2 ml de la solución A de 17 β -dihidroequilenina, 2 ml de la solución A de 17 β -estradiol y 4 ml de la solución A de equilenina. Disolver en 70 ml de acetonitrilo y una vez disueltos completar el volumen con más acetonitrilo. En un tubo de 20 ml de capacidad introducir 5 ml de la solución anterior y 1 ml de la solución de estándar interno. Añadir 1 ml de la mezcla de HCl/ACN y agitar hasta obtener

una solución homogénea. A continuación se añade con cuidado 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

- Solución problema. Pesar exactamente alrededor de 100 mg de materia prima a ensayar traspasarlos cuantitativamente a un matraz de 100 ml. Añadir 5 ml de agua y agitar manualmente hasta disolución completa. Completar el volumen con acetonitrilo. Llevar 5 ml de la solución anterior a un tubo de 20 ml, añadir 1 ml de la solución estándar interno y 1 ml de la solución de HCl/ACN. Dejar en agitación 30 minutos, transcurrido ese tiempo añadir lentamente 1.0 g de bicarbonato sódico. Cuando cese la efervescencia filtrar la solución por papel. Llevar 2 ml de la solución filtrada a un tubo de 10 ml y añadir 1 ml de agua. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.
- Solución problema de estrógenos libres. Pesar exactamente 50 mg de materia prima a analizar. Traspasarlos a un tubo de 20 ml, añadir 3 ml de agua y agitar hasta disolución completa. Añadir 1 ml de solución de estándar interno y 3 ml de acetonitrilo. Homogeneizar y prepara un vial para el equipo cromatográfico.

5.3.1.1.5 Procedimiento

Estabilizar el sistema durante al menos 30 minutos. Inyectar 50 μ l de las soluciones de identificación de cada una de las soluciones de estrógenos individuales. Identificar cada uno de los estrógenos. Inyectar 50 μ l de la solución de cuantificación por quintuplicado. Para considerar que el sistema cromatográfico es idóneo comprobar que la resolución entre todos los picos sea superior a 1.5, el factor de asimetría de los picos debe encontrarse entre 0.85 y 1.5 y el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas para cada uno de los estrógenos en las cinco inyecciones de la solución de estándar debe ser inferior al 2%. Una vez comprobado la idoneidad del sistema, inyectar por triplicado la solución problema y la solución problema de estrógenos libres.

5.3.1.2 Parámetros a validar

5.3.1.2.1 Idoneidad del sistema

5.3.1.2.1.1 Soluciones necesarias

Preparar una solución que contenga la concentración de trabajo siguiendo el método descrito en el apartado 5.3.1.1.4 Soluciones de cuantificación. Inyectar 5 replicados de esta solución.

5.3.1.2.1.2 Expresión de los resultados

Calcular la media y el coeficiente de variación de los resultados de idoneidad. En la tabla 5.3 se muestra los límites para considerar que el sistema funciona perfectamente.

Ensayo	Límites
Precisión: Coeficiente de variación del área Coeficiente de variación del tiempo de retención Coeficiente de variación de la resolución	Inferior al 2% Inferior al 1% Inferior al 1%
Parámetro cromatográfico: Factor de capacidad Platos teóricos Factor de asimetría Resolución	Mayor que 2 Mayor que 2000 0,85-1,5 Mayor que 1,5

Tabla 5.3: Límites para los ensayos de precisión y parámetros cromatográficos de la idoneidad del sistema

5.3.1.2.2 Selectividad

Para el estudio de la selectividad se realizan diferentes soluciones con la finalidad de demostrar que no existen interferencias de las impurezas o sustancias relacionadas.

5.3.1.2.2.1 Soluciones necesarias

5.3.1.2.2.1.1 Identificación individual de cada estrógeno

Preparar las soluciones de identificación según indica el método analítico en el apartado 3.5.5.3 Soluciones para la identificación individual.

5.3.1.2.2.1.2 Identificación del analito

Preparar la solución estándar tal y como indica el apartado 3.5.5.4 Soluciones de cuantificación. Inyectar tres replicados de esta solución.

5.3.1.2.2.1.3 Ausencia de interferencia del estándar interno

Preparar una solución de identificación del estándar interno tal i como indica el apartado 3.5.5.4 Soluciones de cuantificación. Inyectar tres replicados de esta solución.

5.3.1.2.2.1.4 Ausencia de interferencia en una materia prima sometida a stress

Mantener 200 mg de materia prima durante 24 horas a una temperatura de 105 °C. Transcurrido este tiempo tratar la muestra tal y como se describe en el apartado 3.5.5.4 Soluciones de cuantificación. Inyectar tres replicados de esta solución.

5.3.1.2.2.2 Tratamiento de datos

Con los cromatogramas obtenidos se realiza el estudio de la pureza de los picos. El ángulo de pureza obtenido con los picos debe ser inferior al ángulo de pureza del umbral.

5.3.1.2.3 Linealidad

Para evaluar la linealidad se realizan 5 soluciones por triplicado a partir de pesadas independientes de materia prima y siguiendo la preparación de la solución problema descrita en 5.3.1.1.4 Soluciones de cuantificación de: Estrona, Equilina (EQ), 17 α -dihidroequilina (17 α -DHEQ), 17 β -dihidroequilina (17 β -DHEQ) y 17 α -estradiol (17 α -EST). Las soluciones deben abarcan desde el 80% de la especificación inferior hasta el 120% de la especificación superior fijada por la farmacopea para cada uno de los estrógenos.

Para evaluar las impurezas realizar 5 soluciones por triplicado a partir de pesadas independientes de materia prima y siguiendo la preparación de la solución problema descrita en 5.3.1.1.4 Soluciones de cuantificación de: 17 β -estradiol (17 β -EST), Equilenina (EQN), 17 α -dihidroequilenina (17 α -DHEQN) y 17 β -dihidroequilenina (17 β -DHEQN). Las soluciones deben abarcar como mínimo desde el 50% hasta el 120 % de la especificación límite fijada por la farmacopea para cada uno de ellos.

5.3.1.2.3.1 Tratamiento de los resultados

Para evaluar la linealidad de los cinco estrógenos principales se realiza un estudio estadístico que incluye los datos de la recta de regresión que representa la linealidad y el análisis de la variancia. Mientras que para las impurezas se calcula la recta de regresión con sus coeficientes de correlación y determinación y el coeficiente de variación de los factores respuesta.

Para la evaluación estadística de los resultados se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1.

5.3.1.2.3.1.1 Recta de regresión

Se presentara la ecuación de la recta de regresión:

$$y = b * x + a$$

Donde y es la respuesta que consiste en relación entre el área del principio activo y el estándar interno, x es la concentración en $\mu\text{g/ml}$ del principio activo, b es la pendiente de la recta y a el termino independiente.

La pendiente se encuentra relacionada con la sensibilidad del método, cuanto mayor es la pendiente mayor es la sensibilidad del método. El término independiente representa el error sistemático del método y no deber ser estadísticamente diferente a cero.

5.3.1.2.3.1.2 Coeficiente de correlación y determinación

El coeficiente de correlación r nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración) y la y (respuesta). El valor de r debe ser igual o mayor a 0.9990.

El coeficiente de determinación r^2 expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo.

5.3.1.2.3.1.3 Test de linealidad

5.3.1.2.3.1.4 Coeficientes de variación de los factores respuesta (f)

El factor respuesta expresa la relación entre la respuesta y la concentración. En una calibración lineal los factores respuesta deben ser semejantes y cercanos al valor de la pendiente. Para considerar que no hay falta de linealidad el coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser inferior o igual al 5%.

5.3.1.2.3.1.4.1 Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Se trata de comprobar que la pendiente es significativamente diferente a cero mediante una prueba de t de Student. Para calcular la t experimental se utiliza la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{s_b}$$

Donde b es la pendiente de la recta y s_b es la variancia de la pendiente.

Se calcula el intervalo de confianza a partir de la expresión: $b \pm t \cdot s_b$; siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación igual a 0.05 y s_b la variancia de la pendiente.

La t experimental debe ser mayor que la t de Student y en el intervalo de confianza no debe incluir el cero para considerar que la pendiente es significativamente distinta a cero.

5.3.1.2.3.1.4.2 Test de proporcionalidad

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Se evalúa mediante una prueba de t Student. La t experimental se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a}$$

donde a es la variable independiente de la recta y s_a es la variancia de la variable independiente.

Se calcula el intervalo de confianza a partir de la expresión: $a \pm t \cdot s_a$; siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación igual a 0.05 y s_a la variancia del término independiente.

El valor de la t experimental debe ser inferior a la t teórica y el intervalo de confianza debe incluir el cero para poder considerar al término independiente como estadísticamente igual a cero.

5.3.1.2.3.1.4.3 Análisis de la variancia

Para poder aplicar un ANOVA deben cumplirse los siguientes supuestos:

1. Homogeneidad de las variancias. Se debe comprobar que el factor concentración no tiene influencia en la variabilidad de los resultados. Se comprueba realizando un test de Cochran que nos indicara si hay diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de cada nivel de concentración.

2. Normalidad de los residuales. La normalidad de los residuales se comprueba en un test de normalidad.

Después de comprobar la homogeneidad de las variancias y normalidad de los residuales. Aplicar un análisis de la variancia y calcular los valores de los estadístico F_1 y F_2 .

5.3.1.2.4 Precisión

5.3.1.2.4.1 Repetibilidad del sistema instrumental

Se inyecta de forma consecutiva diez veces una solución a la concentración de trabajo.

5.3.1.2.4.1.1 Tratamiento de los datos

Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta. Para considerar que el sistema instrumental es altamente repetitivo, el coeficiente de variación debe ser inferior al 1%, mientras que para las impurezas, el coeficiente de variación se sitúa en el 2%.

5.3.1.2.4.2 Repetibilidad del método

Se realizan 6 replicados de la solución del problema tal y como indica el apartado 5.3.1.1.4 Soluciones de cuantificación.

5.3.1.2.4.2.1 Tratamiento de los datos

Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta. Para considerar correcta la repetibilidad se aplica el criterio de AOAC (106) que establece un límite para el coeficiente de variación de los factores respuesta de 2% en el caso del analito, mientras que para las sustancias relacionadas e impurezas establece un límite para el coeficiente de variación de los factores respuesta de 3.7%

5.3.1.2.4.3 Precisión Intermedia

5.3.1.2.4.3.1 Precisión inter día

Un mismo analista prepara 3 replicados de los niveles de concentración del 80%, 100% y 120% respecto a la concentración de trabajo (niveles estudiados en la linealidad) en dos días diferentes siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.1.2.3 Soluciones de cuantificación.

5.3.1.2.4.3.1.1 Tratamiento de los datos

Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta. Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación para la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método (101).

5.3.1.2.4.3.2 Precisión interanalista

5.3.1.2.4.3.2.1 Tratamiento de los datos

Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta. Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación para la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método (101).

5.3.1.2.5 Exactitud

Calibrar con cinco inyecciones de una solución estándar tal y como indica el método descrito en el apartado 5.3.1.1.5 Procedimiento. Tratar las soluciones del apartado de Precisión intermedia que corresponden a un mismo analista y calcular las concentraciones experimentales.

5.3.1.2.5.1 Tratamiento de los datos

A partir de los resultados de un analista durante los 2 días se calculan las recuperaciones que se obtienen dividiendo las concentraciones experimentales por las concentraciones teóricas y multiplicando por 100. Las concentraciones teóricas se obtienen a partir del certificado del fabricante que utiliza el método descrito en farmacopea por gases. Una vez obtenidas las recuperaciones, se calcula la media, desviación estándar y coeficiente de variación de las muestras. Para los resultados que pertenecen a los 5 estrógenos principales también se aplica una prueba t Student para comprobar que la recuperación obtenida no difiere de la esperada. La t experimental se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$t_{exp} = \frac{|100 - X| \times \sqrt{n}}{CV}$$

donde X es la recuperación media de las muestras, n es el número de muestras y CV es el coeficiente de variación de las recuperaciones.

Para considerar correcta la exactitud, la media de los resultados no debe diferir estadísticamente del valor esperado del 100%. La *t* Student experimental debe ser inferior a la *t* teórica ($\alpha=0.05, k=3, n=6$).

Para los cinco estrógenos principales las recuperaciones deben encontrarse entre el 95% y 105% respecto al contenido teórico mientras que para las sustancias relacionadas e impurezas deben encontrarse entre el 80% al 120% del contenido teórico (101).

5.3.2 Validación del método analítico para los ensayos de uniformidad y contenido

5.3.2.1 Descripción del método

5.3.2.1.1 Condiciones cromatográficas

- Columna: Kromasil 100 C18, 20 x 0,45 cm; 5 μm de tamaño de partícula.
- Fase móvil: Acetonitrilo:Solución 0.025M de dihidrogenofosfato de potasio* (25:75)

*Preparación de la solución reguladora: Pesar 3.4 g de dihidrogenofosfato de potasio y se disuelven en 1000 ml de agua calidad HPLC. Esta solución se filtra a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm .

- Flujo: 2 ml/min
- Longitud de onda: 210 nm
- Volumen de inyección: 20 μl
- Temperatura: 30 °C

5.3.2.1.2 Soluciones necesarias

5.3.2.1.2.1 Solución de estrógenos conjugados

Pesar exactamente 60 mg de estrógenos conjugados (estándar secundario). Llevar a un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.1.2.2 Solución de estándar interno

Pesar exactamente 80 mg de fluoximesterona. Llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta completa disolución.

5.3.2.1.2.3 Solución de estándar

Llevar 2 ml de la solución de estrógenos conjugados y 2 ml de la solución de estándar interno a un matraz aforado de 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y completar el volumen con fase móvil. Filtrar la solución a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de tamaño de 0.45 μm . Las concentraciones teóricas de estrona sulfato sódica y equilina sulfato sódica son 15.84 y 7.392 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

5.3.2.1.2.4 Solución problema

Pesar 20 comprimidos y calcular el peso medio. A continuación pasarlos a un mortero y triturar hasta conseguir un polvo lo más finamente posible. Del polvo obtenido, pesar la cantidad correspondiente a 1.11 mg de materia prima (equivale al peso medio de un comprimido) y llevarlo a un matraz aforado 25 ml. Añadir 5 ml de metanol y mantener en el ultrasonidos durante 5 minutos. Pasado este tiempo y una vez atemperado el matraz completar el volumen con fase móvil. Agitar durante 5 minutos y filtrar a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de 0.45 μm .

5.3.2.1.3 Desarrollo cromatográfico

Injectar 5 replicados de la solución estándar y comprobar la idoneidad del sistema instrumental, para ello las cinco inyecciones deben cumplir los siguientes requisitos:

- Coeficiente de variación del tiempo de retención debe ser inferior al 1%
- Coeficiente de variación de la respuesta de la estrona y equilina debe ser inferior al 2%
- Resolución superior a 1.5 entre los picos contiguos.
- Factor de simetría: 0.85-1.5
- Platos teóricos superiores a 2000.

5.3.2.2 Parámetros a validar

5.3.2.2.1 Idoneidad del sistema

5.3.2.2.1.1 Soluciones necesarias

Preparar una solución que contenga la concentración de trabajo (15 $\mu\text{g/ml}$ de estrona sulfato sódico y 7 $\mu\text{g/ml}$ de equilina sulfato sódico). Injectar 5 replicados de esta solución previamente filtrada por un filtro de peonza de 0.45 μm de acetato de celulosa.

5.3.2.2.1.2 Expresión de los resultados

Calcular la media y el coeficiente de variación de los resultados de idoneidad. En la tabla 5.4 se muestra los límites para considerar que el sistema funciona perfectamente.

Ensayo	Límites
Precisión: Coeficiente de variación del área Coeficiente de variación del tiempo de retención Coeficiente de variación de la resolución	Inferior al 2% Inferior al 1% Inferior al 1%
Parámetro cromatográfico: Factor de capacidad Platos teóricos Factor de asimetría Resolución	Mayor que 2 Mayor que 2000 0.85-1.5 Mayor que 1.5

Tabla 5.4: Parámetros de idoneidad que debe cumplir el sistema.

5.3.2.2.2 Selectividad

Para el estudio de la selectividad se realizan diferentes soluciones con la finalidad de demostrar que no existen interferencias ni de impurezas ni de ningún excipiente.

5.3.2.2.2.1 Soluciones necesarias

5.3.2.2.2.1.1 Identificación del analito

Preparar una solución que contiene la concentración de trabajo (15 µg/ml de estrona sulfato sódico y 7 µg/ml de equilina sulfato sódico) a partir del estándar secundario de estrógenos conjugados. Inyectar tres replicados de esta solución previamente filtrada por un filtro de peonza de 0.45 µm de acetato de celulosa.

5.3.2.2.2.1.2 Ausencia de interferencia de los excipientes

Preparar una solución que contiene la cantidad de placebo equivalente a un comprimido en un volumen de 25 ml de metanol. Inyectar tres replicados de esta solución previamente filtrada por un filtro de peonza de 0.45 µm de acetato de celulosa.

5.3.2.2.2.1.3 Ausencia de interferencia del estándar interno

Preparar una solución que contiene la cantidad de estándar interno equivalente a la concentración de estándar interno en el método. Inyectar tres replicados de esta

solución previamente filtrada por un filtro de peonza de 0.45 µm de acetato de celulosa.

5.3.2.2.2.1.4 Ausencia de interferencia en una muestra sometida a stress

Mantener una muestra de producto acabado equivalente a dos comprimidos durante 24 horas a una temperatura de 105 °C. Transcurrido este tiempo tratar la muestra tal y como indica y describe el apartado 5.3.2.1.2.4 Solución problema. Inyectar tres replicados de esta solución previamente filtrada por un filtro de peonza de 0.45 µm de acetato de celulosa.

5.3.2.2.2.2 Tratamiento de datos

Con los cromatogramas obtenidos se realiza el estudio de la pureza de los pico. El ángulo de pureza obtenido con los picos debe ser inferior al ángulo de pureza del umbral.

5.3.2.2.3 Linealidad

En el ensayo de contenido y uniformidad de dosis la concentración de trabajo es de 15 µg/ml para la estrona sulfato sódico y 7 µg/ml de equilina sulfato sódico. Para evaluar la linealidad se preparan por triplicado 5 soluciones de concentraciones para la estrona sulfato sódico y equilina estrona sulfato sódico que corresponden al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración de trabajo. Todas las concentraciones se consiguen por pesadas independientes.

5.3.2.2.3.1 Soluciones necesarias

5.3.2.2.3.1.1 Solución de estándar interno

Pesar exactamente 80 mg de fluoximesterona. Llevar a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con acetonitrilo. Agitar hasta completa disolución.

5.3.2.2.3.1.2 Solución 50%

Pesar exactamente 30 mg de la materia prima y traspasar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.2.3.1.3 Solución 75%

Pesar exactamente 45 mg de la materia prima y traspasar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.2.3.1.4 Solución 100%

Pesar exactamente 60 mg de la materia prima y traspasar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.2.3.1.5 Solución 125%

Pesar exactamente 75 mg de la materia prima y traspasar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.2.3.1.6 Solución 150%

Pesar exactamente 90 mg de la materia prima y traspasar a un matraz aforado de 100 ml. Añadir 80 ml de agua y sonicar hasta disolución completa. Después de enfriar el matraz completar el volumen con más agua.

5.3.2.2.3.2 Soluciones para evaluar la linealidad

Introducir 200 mg de placebo en un matraz aforado de 25 ml y añadir 2 ml de la solución del nivel correspondiente. Añadir 5 ml de metanol y mantener en el ultrasonidos durante 5 minutos. Pasado este tiempo y una vez atemperado el matraz completar el volumen con fase móvil. Agitar durante 5 minutos y filtrar a través de un filtro de peonza de acetato de celulosa de 0.45 µm. Realizar tres replicados de cada uno de los niveles. Inyectar 20 µl de cada uno de los replicados.

5.3.2.2.3.3 Tratamiento de los resultados

Para evaluar la linealidad se realiza un estudio estadístico que incluye los datos de la recta de regresión que representa la linealidad y el análisis de la variancia según el tratamiento indicado para la validación de la técnica analítica para los estrógenos principales en materia prima en el apartado 5.3.3.1 Tratamiento de los resultados.

5.3.3 Validación del método analítico para el ensayo de disolución

5.3.3.1 Descripción del método

5.3.3.1.1 Condiciones del ensayo

- Medio de disolución: Agua purificada desaireada
- Volumen de disolución: 900 ml
- Temperatura: 37 °C
- Aparato: tipo 2, palas
- Velocidad: 50 rpm
- Toma de muestra: 2, 5 y 8 horas
- Volumen de muestra: 5 ml
- Volumen de reposición: 5 ml de agua purificada desaireada a 37 °C.

5.3.3.1.2 Condiciones cromatograficas

- Columna: Techinert ODS C18, 30mm x 0.46 cm, 3 µm de tamaño partícula.
- Fase móvil: Acetonitrilo : Solución 0.025 de dihidrogenofosfato de potasio* (25:75)

*Preparación de la solución reguladora: Pesar 3.4 g de dihidrogenofosfato de potasio y se disuelven en 1000 ml de agua calidad HPLC. Esta solución se filtra a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm.

- Flujo: 2 ml/min
- Longitud de onda: 210 nm
- Volumen de inyección: 20 µl
- Temperatura: 30 °C

5.3.3.1.3 Soluciones necesarias

5.3.3.1.3.1 Solución estándar

Pesar 10 comprimidos y introducirlos en un matraz aforado de 1000 ml. Completar el volumen con agua y agitar vigorosamente durante 3 horas. Filtrar por papel aproximadamente 200 ml. Tomar 100 ml de solución y llevarlos a un matraz aforado de 900 ml y completar el volumen con agua.

5.3.3.1.3.2 Solución problema

Introducir 1 comprimido en cada uno de los vasos del equipo de disolución. Tomar una alícuota de 5 ml en cada uno de los tiempos especificados anteriormente.

5.3.3.1.4 Desarrollo cromatográfico

Injectar 5 replicados de la solución estándar. Para comprobar la idoneidad del sistema calcular el coeficiente de variación que debe ser inferior al 1.5% y la resolución entre el pico de la estrona y la equilina debe ser superior a 1.5%.

5.3.3.2 Parámetros a validar

El método utilizado en el ensayo de disolución consiste en el descrito en la farmacopea USP 29 (97) por lo tanto no se ha realizado una validación completa, se estudia la selectividad del método para descartar la existencia de interferencias debidas a la matriz del comprimido.

5.3.3.2.1 Selectividad

Para el estudio de la selectividad se realizan diferentes soluciones con la finalidad de demostrar que no existen interferencias ni de impurezas ni de ningún excipiente.

5.3.3.2.1.1 Soluciones necesarias

5.3.3.2.1.1.1 Identificación del principio activo

Pesar 10 comprimidos y introducirlos en un matraz aforado de 1000 ml. Completar el volumen con agua y agitar vigorosamente durante 3 horas. Filtrar por papel aproximadamente 200 ml. Tomar 100 ml de solución y llevarlos a un matraz aforado de 900 ml y completar el volumen con agua.

Por otro lado preparar una solución en agua que contenga la cantidad de estrógenos conjugados equivalente a la concentración obtenida en el ensayo de disolución teniendo en cuenta una liberación del principio activo del 100%.

5.3.3.2.1.1.2 Ausencia de interferencia de los excipientes

Realizar una solución estándar a partir de comprimidos placebo tal y como se describe en el apartado anterior 5.3.3.1.3.1 Solución estándar

5.3.3.2.1.1.3 Ausencia de interferencia en una muestra sometida a stress

Mantener una muestra de producto acabado durante 24 horas a una temperatura de 105 °C. Transcurrido este tiempo tratar la muestra tal y como indica y describe el apartado 5.3.3.1.3.1 Solución estándar.

5.3.3.2.1.2 Tratamiento de datos

Con los cromatogramas obtenidos se realiza el estudio de la pureza de los pico. El ángulo de pureza obtenido con los picos debe ser inferior al ángulo de pureza del umbral.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los criterios de aceptación para cada uno de los estudios realizados están basados tanto en los criterios considerados por la AOAC (106) como en los criterios considerados en la monografía de validación de métodos analíticos editada por AEFI (101).

5.4.1 Resultados de la Validación del método analítico para la valoración de la materia prima e impurezas

En la tabla 5.5 se muestran los límites para considerar correcta la validación del método para los cinco estrógenos principales y en la tabla 5.6 se muestran los límites para considerar correcta la validación del método para las impurezas.

ESPECIFICACIONES DE LA VALIDACIÓN PARA LOS COMPONENTES PRINCIPALES			
Parámetro de la validación	Ensayo o prueba estadística	Bibliografía	Criterio de aceptación
Selectividad	Ausencia de interferencias	AEFI 2001	Ausencia
Linealidad	Coeficiente de correlación r	AEFI 2001	$r > 0.9990$
	Coeficientes de variación de las repuestas	AEFI 2001	Inferior a 5%
	Significación estadística de la pendiente	AEFI 2001	$t_{exp} > 2.16$ Intervalo de confianza no debe incluir el cero
	Test de proporcionalidad	AEFI 2001	$t_{exp} < 2.16$ Intervalo de confianza debe incluir al cero.
	Análisis de la variancia	AEFI 2001	p-valor de F_1 inferior a 0.05 p-valor de F_2 superior a 0.05
Intervalo	Concentración mínima y máxima con correcta linealidad exactitud y precisión	AEFI 2001	Mínimo 80 a 120% concentración de trabajo
Exactitud	T de Student	AEFI 2001	$t_{exp} < 2.042$
	Recuperaciones	AEFI 2001	95-105%
Precisión	Repetibilidad sistema instrumental Repetibilidad del sistema Repetibilidad del método Precisión intermedia	AOAC	Inferior 1% Inferior 2% Inferior 2% Inferior 2.7%

Tabla 5.5: Límites para considerar correcta la validación para los estrógenos principales.

ESPECIFICACIONES DE LA VALIDACIÓN PARA LAS IMPUREZAS			
Parámetro de la validación	Ensayo o prueba estadística	Bibliografía	Criterio de aceptación
Selectividad	Ausencia de interferencias	AEFI 2001	Ausencia
Linealidad	Coeficiente de correlación r	AEFI 2001	$r > 0.990$
	Coeficientes de variación de las repuestas	AEFI 2001	Inferior a 5%
Intervalo	Concentración mínima y máxima con correcta linealidad exactitud y precisión	AEFI 2001	Mínimo 50 a 120% límite
Exactitud	Recuperaciones	AEFI 2001	80-120%
Precisión	Repetibilidad sistema instrumental Repetibilidad solución patrón Repetibilidad del método	AOAC	Inferior 2% Inferior 3.7% Inferior 3.7%
	Precisión intermedia	AEFI 2001	Inferior al doble de la repetibilidad del método obtenida

Tabla 5.6: Límites para considerar correcta la validación para las impurezas descritas en las farmacopeas.

5.4.1.1 Idoneidad del sistema

En las tablas de la 5.7 a la 5.8 se muestran las áreas, los tiempos de retención y la resolución de los picos para evaluar la precisión del sistema cromatográfico obtenido para cinco inyecciones consecutivas de la solución estándar.

Estrógeno conjugado	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Tiempo de retención (min)	Resolución (respecto pico anterior)
17 β -Dihidroequilenina	537677	8.148	7.070
	546395	8.105	6.985
	538129	8.015	7.050
	535801	7.997	7.071
	534712	8.034	6.997
	Media: 538543 $S_{(n-1)}$: 4604 CV %: 0.85%	Media: 8.060 $S_{(n-1)}$: 0.064 CV%:0.80%	Media: 7.035 $S_{(n-1)}$: 0.041 CV%: 0.58%
17 β -Dihidroequilina	270605	9.582	3.136
	275465	9.588	3.116
	273533	9.482	3.146
	273787	9.447	3.127
	273987	9.545	3.125
	Media: 273475 $S_{(n-1)}$: 1772 CV%: 0.65%	Media: 9.530 $S_{(n-1)}$: 0.062 CV%: 0.65%	Media: 3.130 $S_{(n-1)}$: 0.011 Cv%: 0.75%
17 α -Dihidroequilenina	650438	10.332	1.534
	660842	10.288	1.539
	644032	10.165	1.532
	649702	10.113	1.510
	652395	10.257	1.532
	Media: 651482 $S_{(n-1)}$: 6087 CV%: 0.93%	Media: 10.231 $S_{(n-1)}$: 0.090 CV%:0.88%	Media: 1.526 $S_{(n-1)}$: 0.011 CV%: 0.74%

Tabla 5.7: Resultados de la idoneidad del método analítico para los estrógenos conjugados e impurezas (parte 1).

Estrógeno conjugado	Área ($\mu V \cdot s$)	Tiempo de retención (min)	Resolución (respecto pico anterior)
17 β -estradiol	291091	11.882	2.898
	296007	11.838	2.877
	293908	11.715	2.944
	297223	11.663	2.905
	294322	11.753	2.912
	Media: 294510 $S_{(n-1)}$: 2329 CV%: 0.79%	Media: 11.770 $S_{(n-1)}$: 0.089 CV%: 0.76%	Media: 2.907 $S_{(n-1)}$: 0.024 CV%: 0.84%
17 α -Dihidroequilina	1931975	12.698	1.591
	1967978	12.638	1.603
	1952174	12.598	1.612
	1951184	12.447	1.588
	1946731	12.569	1.584
	Media: 1950008 $S_{(n-1)}$: 12893 CV%: 0.66%	Media: 12.590 $S_{(n-1)}$: 0.093 CV%: 0.75%	Media: 1.596 $S_{(n-1)}$: 0.012 CV%: 0.73%
17 α -estradiol	841172	15.082	3.829
	839342	15.022	3.809
	841460	14.954	3.821
	851035	14.813	3.851
	840234	15.010	3.823
	Media: 842649 $S_{(n-1)}$: 4762 CV%: 0.57%	Media: 14.976 $S_{(n-1)}$: 0.102 CV%: 0.68%	Media: 3.827 $S_{(n-1)}$: 0.017 CV%: 0.40%
Equilenina	1118398	16.398	1.869
	1120943	16.288	1.871
	1109234	16.045	1.880
	1112581	16.145	1.892
	1124963	16.262	1.896
	Media: 1117224 $S_{(n-1)}$: 6334 CV%: 0.57%	Media: 16.228 $S_{(n-1)}$: 0.136 CV%: 0.84%	Media: 1.882 $S_{(n-1)}$: 0.012 CV%: 0.64%
Equilina	3842922	18.282	2.619
	3909325	18.172	2.612
	3898920	18.087	2.646
	3896629	18.142	2.664
	3882343	17.954	2.630
	Media: 3886028 $S_{(n-1)}$: 25947 CV %: 0.67	Media: 18.127 $S_{(n-1)}$: 0.120 CV %: 0.66%	Media: 2.634 $S_{(n-1)}$: 0.021 CV%: 0.80%
Estrona	7897654	20.415	2.722
	7913816	20.322	2.728
	7977272	20.134	2.758
	7967118	20.111	2.774
	7956439	20.153	2.753
	Media: 7942460 $S_{(n-1)}$: 34797 CV%: 0.44%	Media: 20.227 $S_{(n-1)}$: 0.134 CV%: 0.66%	Media: 2.747 $S_{(n-1)}$: 0.022 CV%: 0.788

Tabla 5.8: Resultados de la idoneidad del método analítico para los estrógenos conjugados e impurezas (parte2).

En la tabla 5.9 se muestran los parámetros cromatográficos que se obtienen para cada uno de los estrógenos conjugados.

Estrógeno conjugado	Factor de capacidad (k')	Platos teóricos	Factor de asimetría	Resolución
17 β -Dihidroequilenina	6.99	5174	1.070	7.070
17 β -Dihidroequilina	8.44	6111	1.054	3.136
17 α -Dihidroequilenina	9.13	6444	1.032	1.534
17 β -estradiol	10.65	7337	1.045	2.898
17 α -Dihidroequilina	11.45	7544	1.043	1.591
17 α -estradiol	13.79	8356	1.047	3.829
Equilenina	15.08	9027	1.029	1.869
Equilina	16.92	9561	1.009	2.619
Estrona	19.01	9923	1.026	2.722

Tabla 5.9: Valores de los parámetros cromatográficos para cada uno de los estrógenos conjugados.

Se puede concluir que el método desarrollado es óptimo si se tiene en cuenta los parámetros cromatográficos estudiados ya que por un lado los parámetros de precisión para el tiempo de retención, área y la resolución se encuentran por debajo de los establecidos al inicio de la validación. Por otro lado los valores del factor de capacidad para los tres picos en consideración son superiores a 2. Mientras que el número de platos teóricos hallados para los picos superan ampliamente el valor mínimo fijado de 2000. En cuanto al factor de simetría de los picos estudiados se encuentra dentro de los límites establecidos. Por último, la resolución entre dos picos consecutivos en el método desarrollado supera el mínimo para considerar que existe una buena separación entre los picos. En consecuencia se puede decir que se ha demostrado que este método se puede aplicar en rutina y es totalmente idóneo.

5.4.1.2 Selectividad

5.4.1.2.1 Identificación de los estrógenos individuales

En las siguientes figuras 5.1 y 5.2 se identifican los cinco estrógenos principales y las cuatro impurezas.

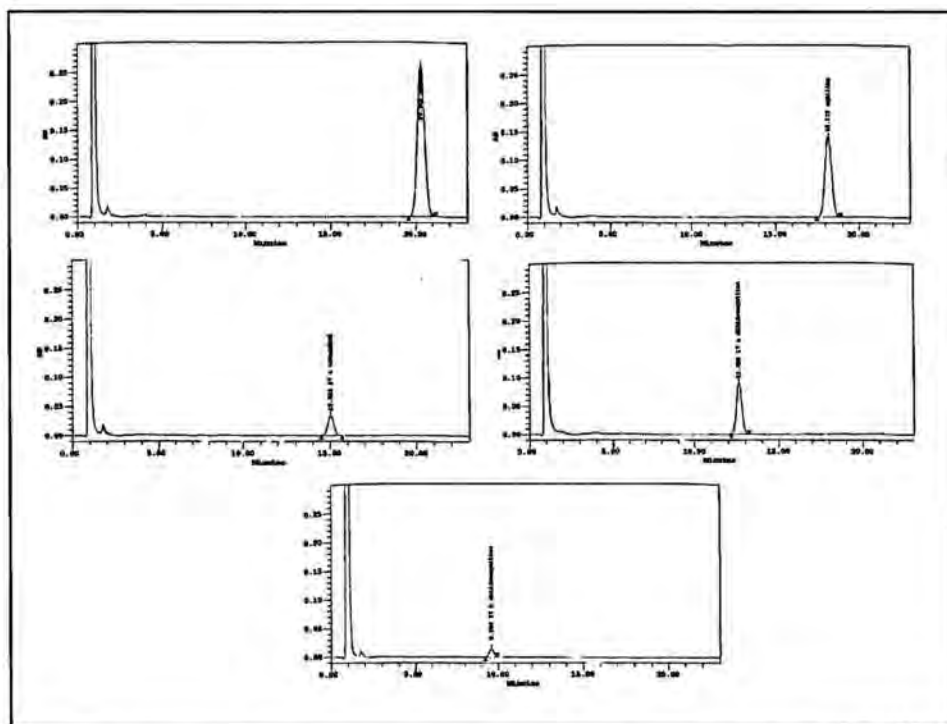


Figura 5.1: Cromatogramas individuales correspondientes a los estrógenos conjugados principales.

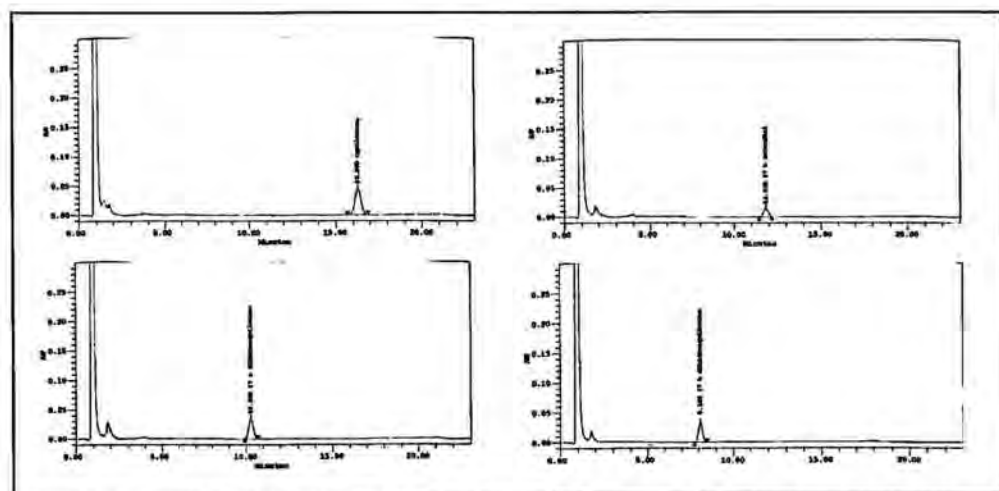


Figura 5.2: Cromatogramas individuales correspondientes a las impurezas de los estrógenos conjugados.

En la tabla 5.10 se describen los diferentes compuestos ya sean los estrógenos principales como las impurezas junto con sus tiempos de retención y tiempo de retención relativo respecto al estándar interno.

Estrógenos conjugados principales		
Estrógeno conjugado	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo
Estrona	20.322	3.794
Equilina	18.172	3.393
17 α -estradiol	15.022	2.805
17 α -Dihidroequilina	12.638	2.360
17 β -Dihidroequilina	9.588	1.790
Impurezas		
Equilenina	16.288	3.041
17 α -Dihidroequilenina	11.838	2.210
17 β -estradiol	10.288	1.921
17 β -Dihidroequilenina	8.105	1.513

Tabla 5.10: Tiempos de retención y tiempos de retención relativos para los estrógenos conjugados e impurezas.

En la figura 5.3 y 5.4 se observan el cromatograma correspondiente al estándar y a un problema. Para los picos del cromatograma problema se les realiza un estudio de pureza de pico que debe encontrar por debajo por debajo del umbral (en la figura Threshold angle) establecido por el sistema en consideración al ruido del aparato y el ángulo del solvente. También se comparan los espectros obtenidos para cada uno de los estrógenos con los espectros de la biblioteca pertenecientes a los estándares.

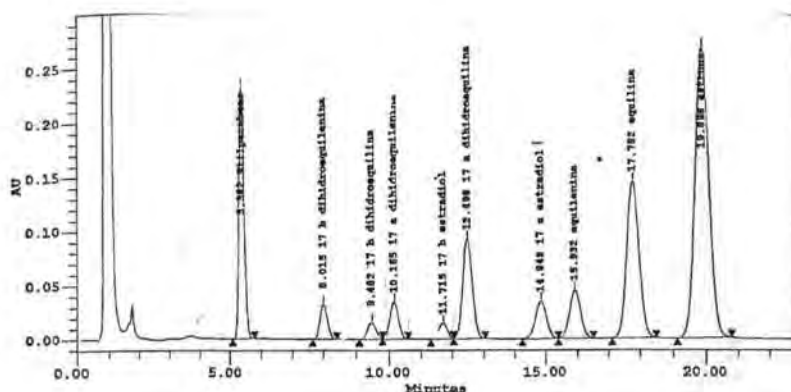


Figura 5.3: Cromatograma correspondiente a la solución estándar.

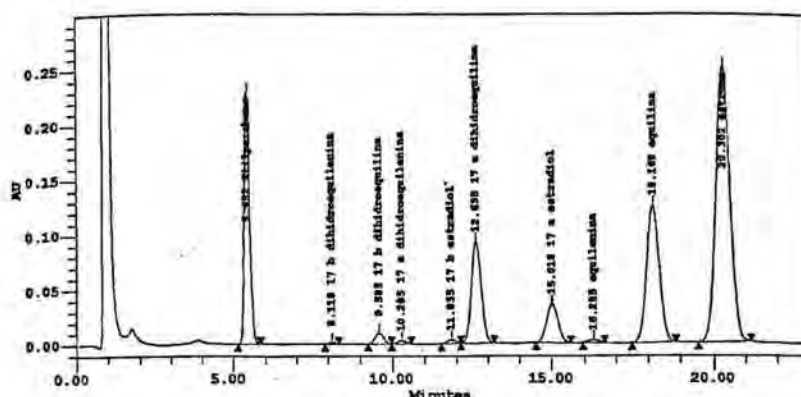


Figura 5.4: Cromatograma correspondiente a una solución problema.

En los cromatogramas del estándar y del problema muestran que todos los ángulos de pureza se encuentran por debajo del umbral lo que indica que no existen interferencias que puedan invalidar el ensayo de selectividad. Por otro lado también se han comparado los espectros de cada uno de los estrógenos de un problema con los espectros almacenados en la biblioteca correspondientes a estrógenos estándares y no se han encontrado diferencias, lo que indica que la identificación de los picos es correcta (figuras de 5.5 a la 5.13).

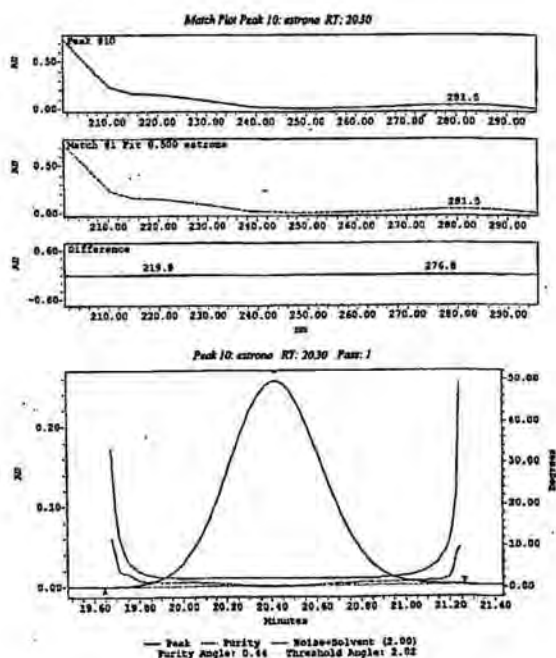


Figura 5.5: Estudio de pureza del pico correspondiente a la estrona.

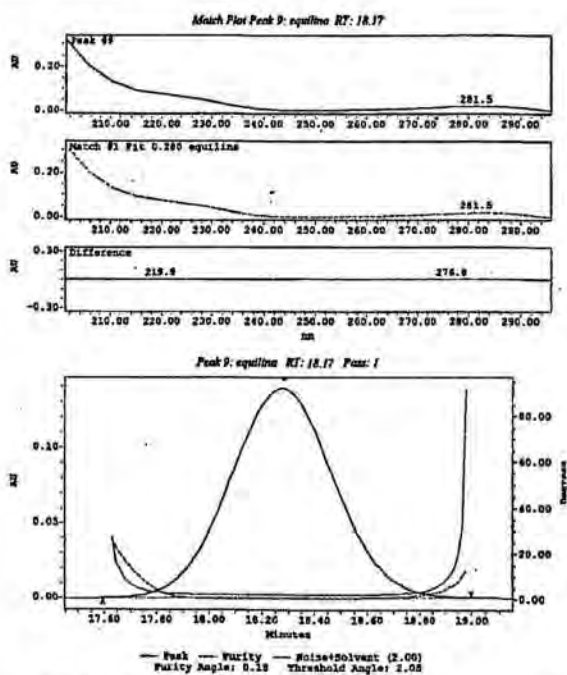


Figura 5.6: Estudio de pureza del pico correspondiente a la equilina.

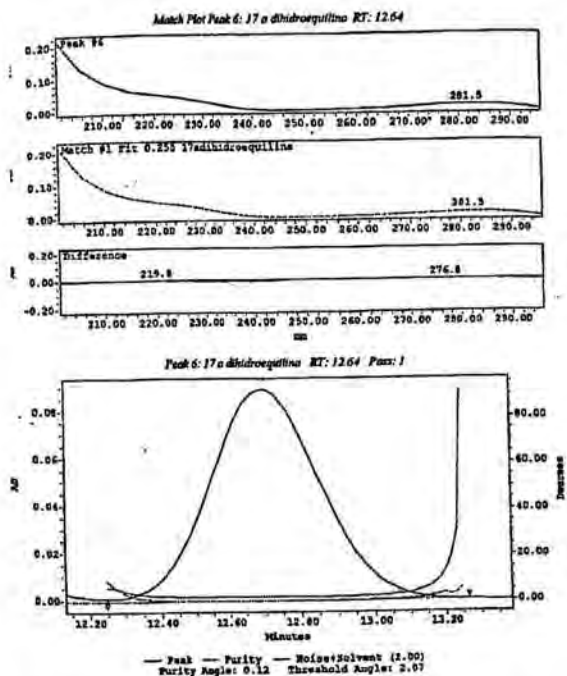


Figura 5.7: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17α-dihidroequilina.

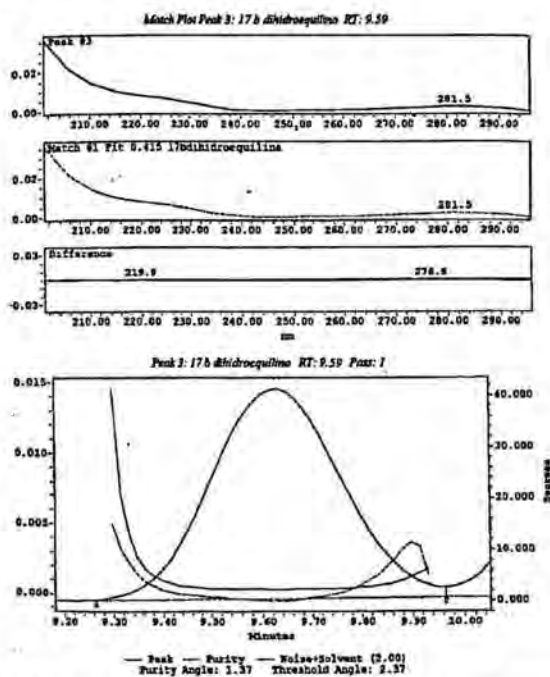


Figura 5.8: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17 β -dihidroequilina.

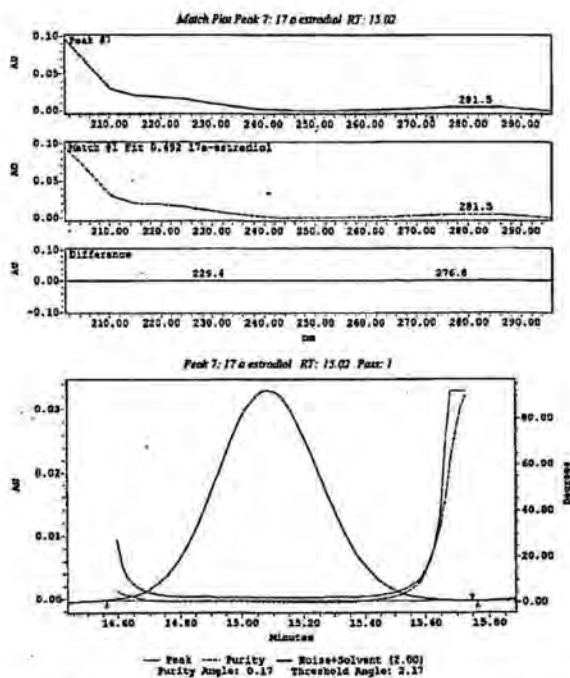


Figura 5.9: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17 α -estradiol.

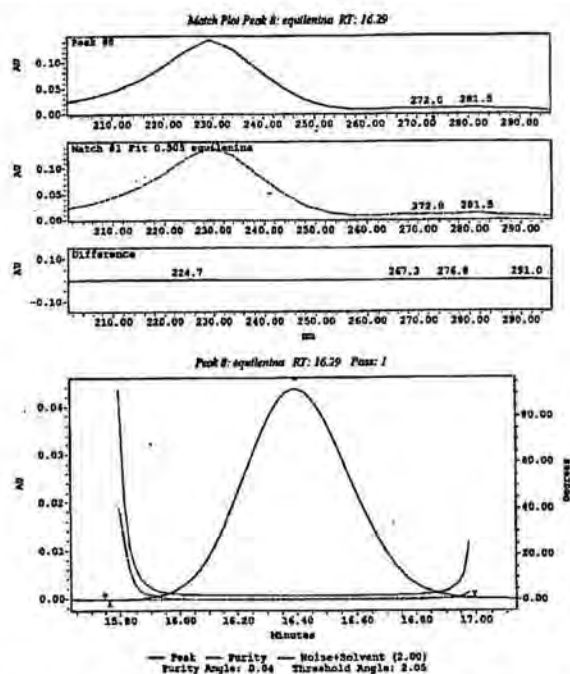


Figura 5.10: Estudio de pureza del pico correspondiente a la equilenina.

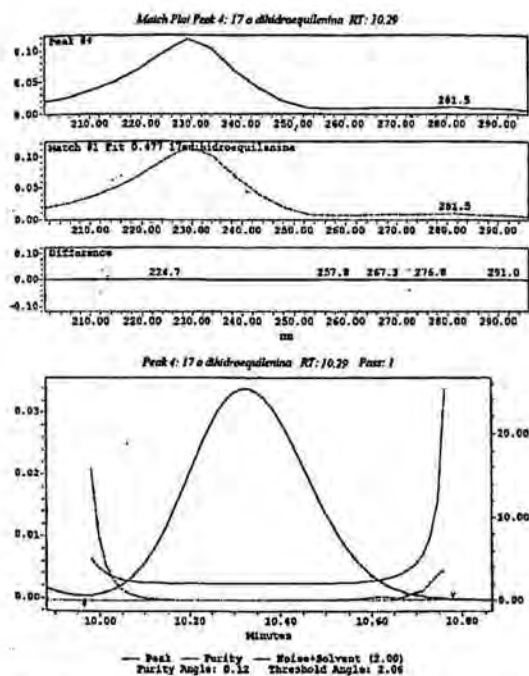


Figura 5.11: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17α-dihidroequilenina.

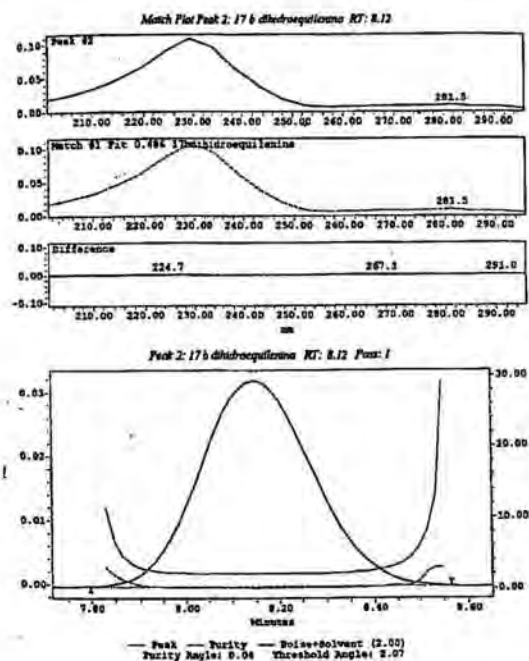


Figura 5.12: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17β-dihidroequilenina.

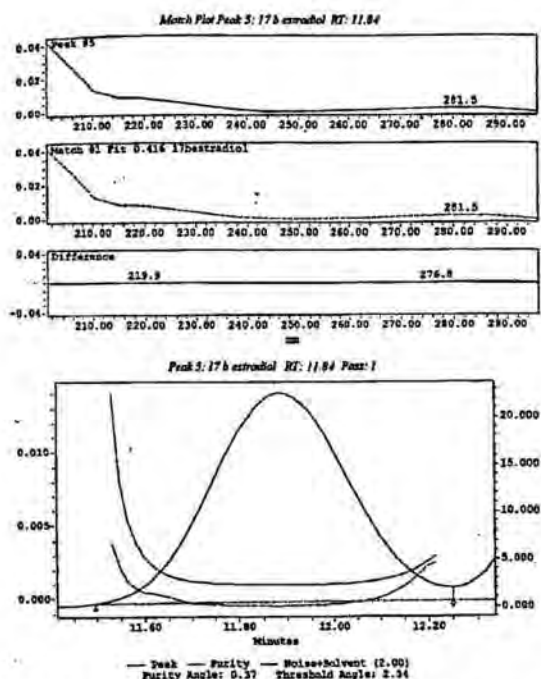


Figura 5.13: Estudio de pureza del pico correspondiente a la 17β-estradiol.

Se concluye por lo tanto que todos los picos de los estrógenos son únicos sin interferencia de ningún pico que pudiera eluir en el mismo tiempo, por lo tanto se trata de un método que posee una buena selectividad.

5.4.1.3 Linealidad del método

5.4.1.3.1 Estrona

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.11 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, la respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación respuesta y concentración). También se indican la media de factor respuesta, la desviación estándar, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta de regresión.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE ESTRONA				
Analista A	CONCENTRACIÓN (X) µg/ml		RESPUESTA (Y)	FACTOR RESPUESTA (Y/X)
	Nivel 1	111.80	2.1946	0.0196
		111.80	2.2308	0.0200
		111.80	2.2036	0.0197
	Nivel 2	131.52	2.6039	0.0198
		131.52	2.6066	0.0198
		131.52	2.6301	0.0200
	Nivel 3	164.41	3.2965	0.0201
		164.41	3.3017	0.0201
		164.41	3.2745	0.0199
	Nivel 4	177.56	3.5398	0.0199
		177.56	3.5732	0.0201
		177.56	3.5629	0.0201
	Nivel 5	197.29	3.9311	0.0199
		197.29	3.9267	0.0199
		197.29	3.9324	0.0199
Ecuación de la recta: y(respuesta)= 0.0202 X (concentración)-0.0468				
r=0.99968 r²=0.99931			Media factor respuesta= 0.0200 S _(n-1) =0.0001 CV%=0.52%	

Tabla 5.11: Resultados y la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la estrona

En la tabla 5.12 se muestra el estudio estadístico de los resultados obtenidos para la estrona. En la figura 5.14 se muestra la representación gráfica de la recta de regresión de la estrona con los intervalos de aceptación y confianza.

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA ESTRONA					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 142.411 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.01989 a 0.02051		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 2.07 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.09581 a 0.00213		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.331101 P-valor = 1.0 Contraste de Bartlett: 1.62492 P-valor = 0.399885			Contraste de Hartley: 39.8072 Test de Levene: 0.379157 P-valor = 0.818608		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 2.66667E-9 Varianza = 0.000269559 Desviación típica = 0.0164183			Mínimo = -0.0210456 Máximo = 0.0267741 Rango = 0.0478197 Asimetría tipificada. = 0.56333* Curtosis tipificada = -1.28245*		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	5.88745	1	5.88745	F ₁ =20280	0.0000*
Residuos	0.00377383	13	0.000290295		
Falta de ajuste	0.00162816	3	0.000542729	F ₂ =2.53	0.1164**
Error puro	0.00214565	10	0.000214565		
Total (Correlación)	5.89123	14			
*Valores de P-valores inferiores o iguales a 0.05 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero.					
**Valores de P-valor mayores o iguales a 0.05 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.12: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad de la estrona

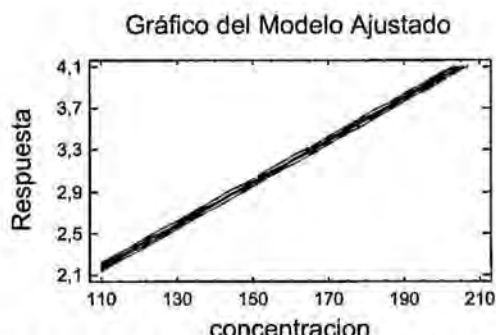


Figura 5.14: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente a la estrona.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.0202x - 0.0468$, siendo el coeficiente de correlación 0.99968, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.93% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.0200, siendo el coeficiente de variación porcentual 0.52%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta (0.0202), lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y respuestas. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental (142.411) es superior a la t teórica (2.16) indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de confianza de la pendiente no incluye el cero (0.01989-0.02051). En cuanto al test de proporcional, se observa que la t experimental (2.07) es menor a la t teórica (2.16: 13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente a cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero (-0.09581 - 0.002013).

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias

utilizado consiste en un test de contraste de Cochran, el valor de p-valor representa el máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (1.0) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por lo tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de 0.56333 y -1.28245, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados, un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p-valor obtenido para F_1 (0) es inferior al nivel de significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 (0.1164) es superior a 0.05 lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra la existencia de una buena linealidad entre los resultados. Con todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de estrona sulfato sódico entre el 80% de la especificación inferior y el 120% de la especificación superior fijadas por la farmacopea.

5.4.1.3.2 Equilina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.13 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). También se indican la media de factor respuesta, la desviación estándar, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta de regresión.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE EQUILINA				
Analista A	Concentración (X) µg/ml		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	46.03	0.9472	0.0206
		46.03	0.9632	0.0209
		46.03	0.9554	0.0208
	Nivel 2	59.19	1.2149	0.0205
		59.19	1.1998	0.0203
		59.19	1.2065	0.0204
	Nivel 3	78.91	1.6343	0.0207
		78.91	1.6054	0.0203
		78.91	1.6114	0.0204
	Nivel 4	92.07	1.9005	0.0206
		92.07	1.8986	0.0206
		92.07	1.8886	0.0205
	Nivel 5	105.22	2.1708	0.0206
		105.22	2.1508	0.0204
		105.22	2.1579	0.0205
Ecuación de la recta: Y(respuesta)= 0.02049 X(concentración)+0.00421				
r=0.999723 r²=0.999445			Media factor respuesta= 0.0205 S(n-1)=0.00013 CV%=0.65%	

Tabla 5.13: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilina.

Por otro lado también se presenta el estudio estadístico de los resultados obtenidos en la tabla 5.14 y la representación gráfica de la ecuación de la recta correspondiente a la linealidad de la equilina con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.15).

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA EQUILINA					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 153.046 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.02020 a 0.02077		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 0.397258 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.01870 a 0.02713		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.467513 P-valor = 0.401981 Contraste de Bartlett: 1.22193 P-valor = 0.796108			Contraste de Hartley: 5.6913 Test de Levene: 0.283856 P-valor = 0.881846		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 1.73333E-9 Varianza = 0.000101 Desviación típica = 0.0100499			Mínimo = -0.0162144 Máximo = 0.0167232 Rango = 0.0329376 Asimetría típi. = -0.00862429 Curtosis típificada = -0.779949		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	2.89709	1	2.89709	F ₁ =23423.12	0.0000
Residuos	0.0016079	13	0.000123685		
Falta de ajuste	0.000612837	3	0.000204279	F ₂ =2.05	0.1704
Error puro	0.000995067	10	0.0000995067		
Total (Correlación)	2.89869	14			
*Valores de P-valor inferiores o iguales a 0.1 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.1 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.14: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad correspondiente a la equilina.

Gráfico del Modelo Ajustado

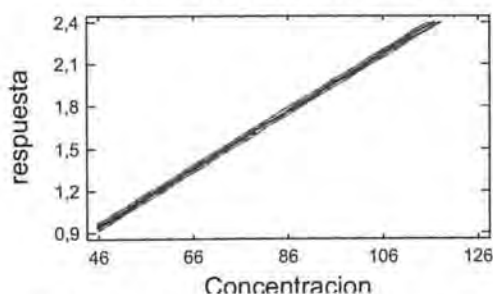


Figura 5.15: Representación gráfica de la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilina.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.02049x + 0.00421$ siendo el coeficiente de correlación 0.9997, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.95% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.0205, siendo el coeficiente de variación porcentual 0.65%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta, lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y la respuesta. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental (153.046) es superior a la t teórica (2.16) indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de la confianza de la pendiente no incluye el cero (0.02020-0.02077). En cuanto al test de proporcionalidad, se observa que la t experimental (0.397258) es menor a la t teórica (2.16: 13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente a cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero (-0.01870 – 0.2713).

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran, el valor de p -valor representa el máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.401981) es mayor que el nivel de significación de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por lo tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de -0.00862429 y -0.779949, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p -valor obtenido para F_1 (0.000) es inferior al nivel de

significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 (0.1704) es superior a 0.05 lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Por todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de equilina sulfato sódico entre el 80% de la especificación inferior y 120% de la especificación superior indicada por la farmacopea.

5.4.1.3.3 17 α -dihidroequilina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.15 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). También se indican la media de factor respuesta, la desviación estándar, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta de regresión.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17 α -DIHIDROEQUILINA				
Analista A	Concentración (X) $\mu\text{g/ml}$		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	28.94	0.4769	0.0165
		28.94	0.4634	0.0160
		28.94	0.4593	0.0159
	Nivel 2	39.46	0.6434	0.0163
		39.46	0.6294	0.0160
		39.46	0.6357	0.0161
	Nivel 3	52.61	0.8658	0.0165
		52.61	0.8450	0.0161
		52.61	0.8508	0.0162
	Nivel 4	65.76	1.0560	0.0161
		65.76	1.0966	0.0167
		65.76	1.0842	0.0165
	Nivel 5	78.91	1.2832	0.0163
		78.91	1.2694	0.0161
		78.91	1.2755	0.0162
Ecuación de la recta: $Y(\text{respuesta}) = 0.01633 X(\text{concentración}) - 0.00546$				
$r = 0.999231$ $r^2 = 0.998462$			Media factor respuesta = 0.0162 $S_{(n-1)} = 0.00021$ CV% = 1.32%	

Tabla 5.15: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a 17 α -dihidroequilina.

Por otro lado también se presenta el estudio estadístico de los resultados obtenidos en la tabla 5.16 y la representación gráfica de la ecuación de la recta correspondiente a la linealidad de la 17 α -dihidroequilina con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.16).

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA 17 α -DIHIDROEQUILINA					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 91.8556 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.01595 a 0.01672		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 0.548225 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.02699 a 0.01606		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.593089 P-valor = 0.137079 Contraste de Bartlett: 1.46142 P-valor = 0.531131			Contraste de Hartley: 9.05193 Test de Levene: 0.610977 P-valor = 0.664222		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 3.40667E-9 Varianza = 0.000140574 Desviación típica = 0.0118564			Mínimo = -0.0138252 Máximo = 0.0281292 Rango = 0.0419544 Asimetría típ. = 1.70035 Curtosis tipificada = 0.539901		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	1.27732	1	1.27732	F ₁ =8437.44	0.0000
Residuos	0.00196804	13	0.000151388		
Falta de ajuste	0.000508244	3	0.000169415	F ₂ =1.16	0.3724
Error puro	0.00145979	10	0.000145979		
Total (Correlación)	1.27929	14			
*Valores de P-valor inferiores o iguales a 0.1 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.1 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.16: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad de la 17 α -dihidroequilina

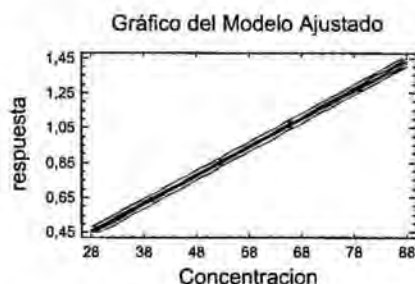


Figura 5.16: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente a 17α-dihidroequilina.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.01633x - 0.00546$ siendo el coeficiente de correlación 0.9992, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.85% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.0162, siendo el coeficiente de variación porcentual 1.32%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta, lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y respuestas. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental (91.8556) es superior a la t teórica (2.16) indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de la confianza de la pendiente no incluye el cero (0.01595-0.01672). En cuanto al test de proporcionalidad, se observa que la t experimental (0.548225) es menor a la t teórica (2.16, 13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente a cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero (-0.02699 – 0.01606).

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran, el valor de p-valor representa el

máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.137079) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por lo tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de 1.70035 y 0.539901, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p-valor obtenido para F_1 (0.000) es inferior al nivel de significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 (1.16) es superior a 0.05 lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Por todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de 17 α -dihidroequilina sulfato sódico entre el 80% de la especificación inferior y 120% de la especificación superior indicada por la farmacopea.

5.4.1.3.4 17 β -dihidroequilina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.17 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta el estudio estadístico de los resultados obtenidos en la tabla 5.18 y la representación gráfica de la ecuación de la recta correspondiente a la linealidad de la 17 β -dihidroequilina con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.17).

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17β-DIHIODROEQUILINA				
Analista A	Concentración (X) µg/ml		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	0.99	0.0167	0.0169
		0.99	0.0165	0.0167
		0.99	0.0173	0.0175
	Nivel 2	1.97	0.0351	0.0178
		1.97	0.0342	0.0174
		1.97	0.0336	0.0171
	Nivel 3	5.92	0.1033	0.0174
		5.92	0.1007	0.0170
		5.92	0.1021	0.0172
	Nivel 4	9.86	0.1739	0.0176
		9.86	0.1700	0.0172
		9.86	0.1683	0.0171
	Nivel 5	13.81	0.2408	0.0174
		13.81	0.2339	0.0169
		13.81	0.2356	0.0171
Ecuación de la recta: Y(respuesta)= 0.01719 X(concentración)+ 0.00016				
r=0.999231 r ² =0.998462			Media factor respuesta=0.0173 S _(n-1) =0.00027 CV%=1.57%	

Tabla 5.17: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a 17 β -dihidroequilina.

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA 17β-DIHIIDROEQUILINA					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 156.081 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.01695 a 0.01743		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 0.179412 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.00177 a 0.00209		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.538622 P-valor = 0.226568 Contraste de Bartlett: 2.13083 P-valor = 0.177549			Contraste de Hartley: 22.9408 Test de Levene: 0.87049 P-valor = 0.514428		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 1.00000E-9 Varianza = 0.00000391816 Desviación típica = 0.00197943			Mínimo = -0.00366753 Máximo = 0.00423686 Rango = 0.00790439 Asimetría típi. = 0.828838 Curtosis típicada = 0.652039		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	0.102794	1	0.102794	F ₁ =24361.23	0.0000
Residuos	0.0000548542	13	0.00000421956		
Falta de ajuste	0.00000686756	3	0.00000228919	F ₂ =0.48	0.7053
Error puro	0.0000479867	10	0.000145979		
Total (Correlación)	0.102848	14			
*Valores de P-valor inferiores o iguales a 0.1 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.1 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.18: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad correspondiente a la 17β-dihidroequilina.

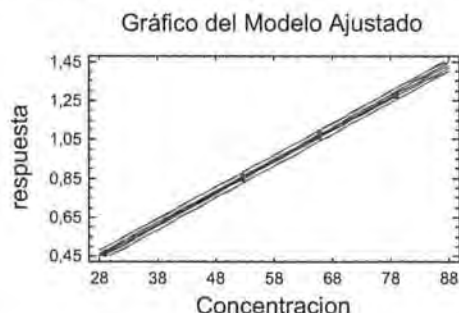


Figura 5.17: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente a 17β-dihidroequilina.

La ecuación de la recta obtenida que relaciona la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.01719x + 0.00016$ siendo el coeficiente de correlación 0.9992, valor

superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.85% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.0173, siendo el coeficiente de variación porcentual 1.57%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta, lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y respuestas. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental (156.081) es superior a la t teórica (2.16) indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de la confianza de la pendiente no incluye el cero (0.01695-0.01743). En cuanto al test de proporcional, se observa que la t experimental (0.1794) es menor a la t teórica (2.16, 13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente a cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero (-0.00177 – 0.00209).

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran, el valor de p -valor representa el máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.226568) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por lo tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de 0.828838 y 0.652039, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p -valor obtenido para F_1 (0.0000) es inferior al nivel de significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p -valor obtenido para F_2 (0.48) es superior a 0.05

lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Por todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de 17 β -dihidroequilina sulfato sódico entre el 80% de la especificación inferior y 120% de la especificación superior indicada por la farmacopea.

5.4.1.3.5 17 α -estradiol

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.19 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17 α -ESTRADIOL				
Analista A	Concentración (X) μ g/ml		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	2.30	0.04521	0.0197
		2.30	0.0432	0.0188
		2.30	0.0436	0.0190
	Nivel 2	4.60	0.0883	0.0192
		4.60	0.0894	0.0194
		4.60	0.0875	0.0190
	Nivel 3	13.81	0.2645	0.0192
		13.81	0.2639	0.0191
		13.81	0.2664	0.0193
	Nivel 4	23.02	0.4404	0.0191
		23.02	0.4389	0.0191
		23.02	0.4478	0.0195
	Nivel 5	32.22	0.6236	0.0194
		32.22	0.6310	0.0196
		32.22	0.6196	0.0192
Ecuación de la recta: Y(respuesta)= 0.01937 X(concentración) - 0.00137				
r=0.999892 r ² =0.999784			Media factor respuesta=0.0193 S _(n-1) =0.0001737 CV%=0.90%	

Tabla 5.19: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad correspondiente a 17 α -estradiol.

Por otro lado también se presenta el estudio estadístico de los resultados obtenidos en la tabla 5.20 y la representación gráfica de la ecuación de la recta correspondiente a la linealidad de la 17 α -estradiol con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.18).

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA 17 α -ESTRADIOL					
Significación estadística de la pendiente					
$t_{\text{experimental}}= 245.402$ $t_{\text{tablas}}= 2.16$			Intervalo de confianza: 0.01920 a 0.01954		
Test de proporcionalidad					
$t_{\text{experimental}}= 0.179412$ $t_{\text{tablas}}= 2.16$			Intervalo de confianza: -0.00459 a 0.00185		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.558467 P-valor = 0.19003 Contraste de Bartlett: 2.84136 P-valor = 0.0689856			Contraste de Hartley: 36.7619 Test de Levene: 1.0807 P-valor = 0.416266		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = -4.06667E-10 Varianza = 0.0000109627 Desviación típica = 0.00331099			Mínimo = -0.00566871 Máximo = 0.00821052 Rango = 0.0138792 Asimetría tipi. = 1.06939 Curtosis tipificada = 1.46577		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	0.710983	1	0.710983	$F_1=60222.35$	0.0000
Residuos	0.000153478	13	0.000011806		
Falta de ajuste	0.0000336735	3	0.0000112245	$F_2=0.94$	0.4586
Error puro	0.000119804	10	0.0000119804		
Total (Correlación)	0.711137	14			
*Valores de P-valor inferiores o iguales a 0.1 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.1 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.20: Estudio estadístico de los resultados obtenidos en la linealidad correspondiente a 17 α -estradiol.

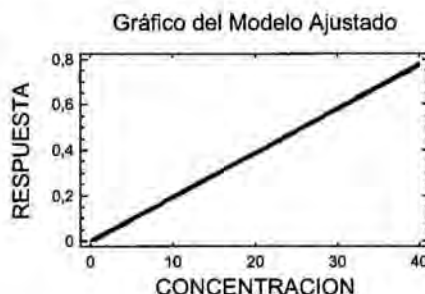


Figura 5.18: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente al 17 α -estradiol.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.01937x - 0.00137$ siendo el coeficiente de correlación 0.9999, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.98% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio de del factor respuesta, se obtiene una media de 0.0193, siendo el coeficiente de variación porcentual 0.90%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta, lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y respuestas. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental (245.402) es superior a la t teórica (2.16) indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de la confianza de la pendiente no incluye el cero (0.01920-0.01954). En cuanto al test de proporcional, se observa que la t experimental (0.179412) es menor a la t teórica (2.16, 13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente a cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero (-0.00459 – 0.00185).

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran, el valor de p-valor representa el

máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.19003) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por lo tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de 1.06939 y 1.46577, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p-valor obtenido para F_1 (0.0000) es inferior al nivel de significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 (0.4586) es superior a 0.05 lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Por todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones 17 α -estradiol entre el 80% de la especificación inferior y 120% de la especificación superior indicada por la farmacopea.

5.4.1.3.6 17 β -estradiol

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.21 donde se indican las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta la representación de la recta de regresión con los intervalos de aceptación y confianza en la figura 5.19.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17 β -ESTRADIOL				
Análisis A	Concentración (X) $\mu\text{g/ml}$		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	0.53	0.0117	0.0221
		0.53	0.0110	0.0208
		0.53	0.0107	0.0202
	Nivel 2	1.12	0.0250	0.0223
		1.12	0.0234	0.0209
		1.12	0.0245	0.0219
	Nivel 3	3.75	0.0751	0.0200
		3.75	0.0743	0.0198
		3.75	0.0738	0.0197
	Nivel 4	6.40	0.1253	0.0196
		6.40	0.1300	0.0203
		6.40	0.1242	0.0194
	Nivel 5	9.02	0.1755	0.0195
		9.02	0.1765	0.0196
		9.02	0.1800	0.0200
	Ecuación de la recta: $Y(\text{respuesta}) = 0.01950 X(\text{concentración}) + 0.001544$			
	$r = 0.999688$ $r^2 = 0.99936$		Media factor respuesta = 0.0204 $S_{(n-1)} = 0.00098$ $CV\% = 4.82\%$	

Tabla 5.21: Resultados y la recta de regresión de la linealidad correspondiente a 17 β -estradiol.

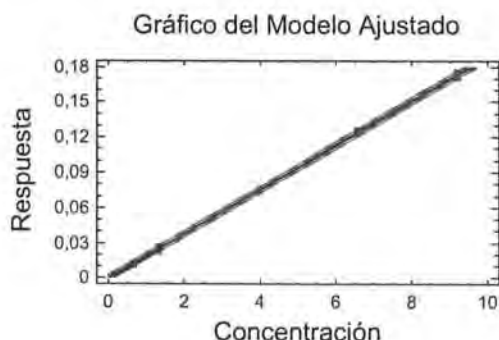


Figura 5.19: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente a 17 β -estradiol.

5.4.1.3.7 17 α -dihidroequilenina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.22 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y

concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta la representación gráfica de la linealidad correspondiente a la 17 α -dihidroequilenina con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.20).

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17 α -DIHIDROEQUILENINA				
Analista A	Concentración (X) $\mu\text{g/ml}$		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	0.82	0.0239	0.0291
		0.82	0.0247	0.0301
		0.82	0.0212	0.0259
	Nivel 2	1.64	0.0483	0.0295
		1.64	0.0454	0.0277
		1.64	0.0443	0.0270
	Nivel 3	4.93	0.1445	0.0293
		4.93	0.1399	0.0284
		4.93	0.1407	0.0285
	Nivel 4	8.22	0.2365	0.0288
		8.22	0.2237	0.0272
		8.22	0.2155	0.0262
	Nivel 5	11.51	0.3375	0.0293
		11.51	0.3026	0.0263
		11.51	0.3111	0.0270
Ecuación de la recta: $Y(\text{respuesta})= 0.02739 X(\text{concentración}) + 0.00208$				
$r=0.997264$ $r^2=0.994536$			Media factor respuesta=0.0279 $S_{(n-1)}=0.001179$ CV%=4.22%	

Tabla 5.22: Resultados y la recta de regresión de la linealidad correspondiente a 17 α -dihidroequilenina.

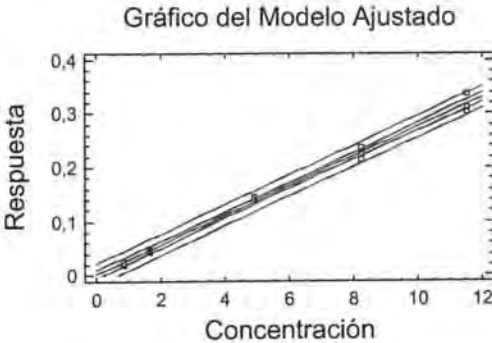


Figura 5.20: Representación gráfica de la recta de regresión representativa de la linealidad correspondiente a 17 α -dihidroequilenina

5.4.1.3.8 17 β -dihidroequilenina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.23 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta la representación gráfica de la linealidad correspondiente a la 17 β -dihidroequilenina con los intervalos de aceptación y confianza (figura 5.21).

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE 17 β -DIHIDROEQUILENINA				
Analista A	Concentración (X) μ g/ml		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	0.66	0.0201	0.0305
		0.66	0.0197	0.0298
		0.66	0.0191	0.0290
	Nivel 2	1.32	0.0404	0.0306
		1.32	0.0387	0.0293
		1.32	0.0396	0.0300
	Nivel 3	3.95	0.1129	0.0286
		3.95	0.1145	0.0290
		3.95	0.1208	0.0306
	Nivel 4	6.58	0.2005	0.0305
		6.58	0.1887	0.0287
		6.58	0.1933	0.0294
	Nivel 5	9.21	0.2609	0.0283
		9.21	0.2618	0.0284
		9.21	0.2589	0.0281
	Ecuación de la recta: Y(respuesta)= 0.02840 X(concentración) + 0.00261			
	r=0.999071 r ² =0.998143		Media factor respuesta=0.0294 S _(n-1) =0.00088 CV%=3.01%	

Tabla 5.23: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a la 17 β -dihidroequilenina.

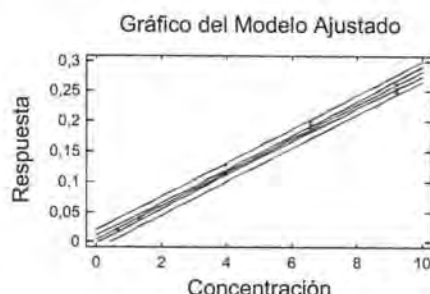


Figura 5.21: Representación gráfica correspondiente a la linealidad de la 17 β -dihidroequilenina

5.4.1.3.9 Equilenina

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.24 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). En este mismo cuadro se indican la media de factor respuesta, desviación estándar, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta la representación gráfica de la linealidad correspondiente a la equilenina (figura 5.22).

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE EQUILENINA				
Analista A	Concentración (X) $\mu\text{g/ml}$		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 1	2.63	0.0790	0.0300
		2.63	0.0806	0.0306
		2.63	0.0812	0.0309
	Nivel 2	7.89	0.2358	0.0299
		7.89	0.2431	0.0308
		7.89	0.2466	0.0313
	Nivel 3	13.15	0.4051	0.0308
		13.15	0.3984	0.0303
		13.15	0.4123	0.0314
	Nivel 4	18.41	0.5508	0.0299
		18.41	0.5074	0.0276
		18.41	0.5154	0.0280
	Nivel 5	22.56	0.6850	0.0304
		22.56	0.6678	0.0296
		22.56	0.6900	0.0306
	Ecuación de la recta: $Y(\text{respuesta}) = 0.02941 X(\text{concentración}) + 0.006350$			
	$r = 0.996979$ $r^2 = 0.993967$		Media factor respuesta = 0.0301 $S_{(n-1)} = 0.0010804$ CV% = 3.59%	

Tabla 5.24: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilenina.

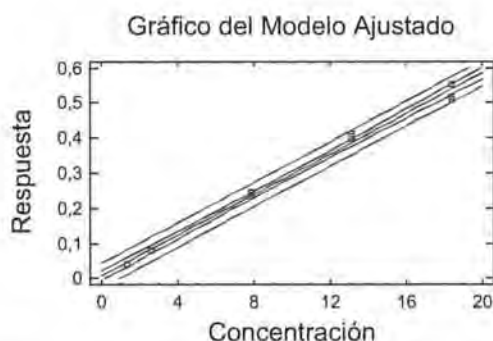


Figura 5.22: Representación gráfica la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilenina

5.4.1.4 Resultados y discusión de la precisión

5.4.1.4.1 Repetibilidad del sistema instrumental

En la tabla 5.25 se presentan las respuestas obtenidas para los cinco estrógenos conjugados concomitantes en el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental. También se presenta la media, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

RESULTADOS DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA INSTRUMENTAL					
Número de inyección	Estrona	Equilina	17 α -dihidroequilina	17 β -dihidroequilina	17 α -estradiol
1	3.0669	1.5000	0.7511	0.1054	0.3276
2	3.0806	1.4942	0.7487	0.1059	0.3250
3	3.0765	1.4940	0.7454	0.1047	0.3195
4	3.0773	1.5187	0.7589	0.1051	0.3235
5	3.0944	1.5078	0.7427	0.1044	0.3213
6	3.0818	1.4886	0.7598	0.1046	0.3277
7	3.0951	1.5020	0.7431	0.1037	0.3280
8	3.0859	1.5108	0.7450	0.1053	0.3232
9	3.0684	1.5079	0.7402	0.1039	0.3240
10	3.0989	1.5049	0.7474	0.1058	0.3186
Media:	3.0826	1.5029	0.7482	0.1034	0.3238
S _(n-1) :	0.0104	0.0086	0.0063	0.0009	0.0032
CV(%):	0.34%	0.57%	0.84%	0.82%	0.98%

Tabla 5.25: Resultados obtenidos en la repetibilidad del sistema instrumental correspondiente a los cinco estrógenos principales.

El valor medio de la respuesta de la estrona es de 3.0826, la desviación estándar corresponde a 0.0104 y el coeficiente de variación es de 0.34%. Para la equilina se

obtiene un valor medio de la respuesta de 1.5029, la desviación estándar corresponde a 0.0086 y presenta un coeficiente de variación de 0.57%. El valor medio de la respuesta obtenido para la 17 α -dihidroequilina es 0.7482. La desviación estándar es de 0.0063 y se obtiene un coeficiente de variación de 0.84%. Para la 17 β -dihidroequilina se obtiene un valor medio de la respuesta de 0.1034, una desviación estándar de 0.0009 y un coeficiente de variación de 0.82. Para el 17 α -estradiol, se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.3238, una desviación estándar de 0.0032 y un coeficiente de variación de 0.98%. Los coeficientes de variación de las respuestas para los cinco estrógenos principales son inferiores al valor límite de 1% especificado al inicio de la validación por lo tanto el sistema cromatográfico posee de una buena repetibilidad del sistema instrumental para los cinco estrógenos principales.

En la tabla 5.26 se presentan las respuestas obtenidas para las cuatro impurezas en el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental. También se presenta la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

RESULTADOS DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA INSTRUMENTAL				
Número de inyección	Equilenina	17 α -dihidroequilina	17 β -dihidroequilina	17 β -estradiol
1	0.4283	0.2500	0.2063	0.1144
2	0.4209	0.2512	0.1976	0.1148
3	0.4230	0.2542	0.1973	0.1133
4	0.4348	0.2460	0.2025	0.1140
5	0.4295	0.2470	0.2030	0.1128
6	0.4328	0.2431	0.2043	0.1114
7	0.4344	0.2545	0.1970	0.1155
8	0.4207	0.2454	0.2026	0.1135
9	0.4350	0.2576	0.1980	0.1132
10	0.4283	0.2533	0.1951	0.1148
Media:	0.4288	0.2502	0.2004	0.1138
S _(n-1) :	0.0053	0.0045	0.0036	0.0011
CV(%):	1.24%	1.80%	1.80%	1.00%

Tabla 5.26: Resultados obtenidos en la repetibilidad instrumental correspondientes a las cuatro impurezas.

Se obtiene un valor medio de la respuesta para la equilenina de 0.4288, una desviación estándar de 0.0053 y un coeficiente de variación de 1.24%. Para la 17 α -dihidroequilina se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.2502, una desviación estándar de 0.0045 y un coeficiente de variación de 1.80%. El valor medio de la respuesta obtenido para la 17 β -dihidroequilina es de 0.2004, una desviación

estándar de 0.0036 y un coeficiente de variación de 1.80%. Por último se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.1138, una desviación estándar de 0.011 y un coeficiente de variación de 1.00%. En todos los casos el coeficiente de variación obtenido está por debajo del límite del 2% establecido para el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental para las impurezas, demostrando que el equipo utilizado posee una buena repetibilidad instrumental para las cuatro impurezas.

5.4.1.4.2 Repetibilidad del método

Los resultados obtenidos para el estudio de la repetibilidad del método a partir de seis muestras independientes son los que se muestran en la tabla 5.27, en donde se reflejan los factores respuesta obtenidos para los cinco estrógenos conjugados principales. Se muestra la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las respuestas para cada uno de los estrógenos.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO				
Estrona	Equilina	17 α -dihidroequilina	17 β -dihidroequilina	17 α -estradiol
0.0198	0.0203	0.0159	0.0174	0.0195
0.0195	0.0206	0.0163	0.0174	0.0198
0.0201	0.0203	0.0160	0.0170	0.0193
0.0198	0.0207	0.0160	0.0177	0.0198
0.0198	0.0206	0.0162	0.0174	0.0195
0.0203	0.0208	0.0164	0.0173	0.0202
Media: 0.0199 S _(n-1) : 0.0003 CV%: 1.39%	Media: 0.0206 S _(n-1) : 0.0002 CV%: 1.09%	Media: 0.0162 S _(n-1) : 0.0002 CV%: 1.12%	Media: 0.0174 S _(n-1) : 0.0002 CV%: 1.27%	Media: 0.0197 S _(n-1) : 0.0003 CV%: 1.54%

Tabla 5.27: Resultados obtenidos en la repetibilidad del método correspondiente a los cinco estrógenos conjugados principales.

Se obtiene un valor medio para el factor respuesta de la estrona de 0.0199, una desviación estándar y un coeficiente de variación del factor respuesta de 1.39%. Para la equilina se obtiene un valor medio del factor respuesta de 0.0206, una desviación estándar de 0.0002 y un coeficiente de variación de 1.09%. Se obtiene un valor medio del factor respuesta para 17 α -dihidroequilina de 0.0162, una desviación estándar de 0.0002 y un coeficiente de variación de 1.12%. Para la 17 β -dihidroequilina se obtiene un valor medio para el factor respuesta de 0.0174, una desviación estándar de 0.0002 y un coeficiente de variación de 1.27%. Por último, se obtiene para el 17 α -estradiol un valor medio del factor respuesta de 0.0197, una desviación estándar de 0.0003 y un coeficiente de variación de 1.54%. Los coeficientes de variación de las respuestas

para los cinco estrógenos principales son inferiores al valor límite de 2.7% especificado al inicio de la validación por lo tanto el método analítico dispone de una buena repetibilidad del método para los cinco estrógenos conjugados principales.

En la tabla 5.28 se presentan los factores respuesta obtenidos para las cuatro impurezas en el estudio de la repetibilidad del método. También se presenta la media, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO			
Equilenina	17 α -dihidroequilenina	17 β -dihidroequilenina	17 β -estradiol
0.0289	0.0285	0.0292	0.0189
0.0299	0.0272	0.0303	0.0200
0.0298	0.0302	0.0302	0.0193
0.0294	0.0283	0.0294	0.0197
0.0291	0.0285	0.0321	0.0186
0.0288	0.0296	0.0297	0.0186
Media: 0.0293 S _(n-1) : 0.0005 CV%:1.60%	Media: 0.0287 S _(n-1) : 0.0011 CV%:3.70%	Media: 0.0301 S _(n-1) : 0.0011 CV%:3.50%	Media: 0.0192 S _(n-1) : 0.0006 CV%:3.07%

Tabla 5.28: Resultados obtenidos en la repetibilidad del sistema correspondiente a las cuatro impurezas.

Se obtiene un valor medio de la respuesta para la equilenina de 0.0293, una desviación estándar de 0.0005 y un coeficiente de variación de 1.60%. Para la 17 α -dihidroequilenina se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.0287, una desviación estándar de 0.0011 y un coeficiente de variación de 3.70%. El valor medio de la respuesta obtenido para la 17 β -dihidroequilenina es de 0.0301, una desviación estándar de 0.0011 y un coeficiente de variación de 3.50%. Por último se obtiene un valor medio para la respuesta de 17 β -estradiol de 0.0192, una desviación estándar de 0.0006 y un coeficiente de variación de 3.07%. En todos los casos el coeficiente de variación obtenido está por debajo del límite del 3.7% establecido para el estudio de la repetibilidad del sistema para las impurezas, demostrando que el método funciona bien y es repetitivo.

5.4.1.4.3 Precisión intermedia

En la tabla 5.29 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión intermedia interdía para los cinco estrógenos conjugados principales. También se

presentan los valores de la media, desviación estándar y coeficiente de variación del factor respuesta en estudio.

RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA (mismo analista, diferentes días)									
Estrona		Equilina		17 α -dihidroequilina		17 β -dihidroequilina		17 α -estradiol	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
0.0196	0.0195	0.0206	0.0206	0.0165	0.0163	0.0167	0.0169	0.0197	0.0194
0.0200	0.0202	0.0209	0.0203	0.0160	0.0164	0.0167	0.0178	0.0188	0.0200
0.0197	0.0202	0.0208	0.0205	0.0159	0.0163	0.0175	0.0174	0.0190	0.0204
0.0201	0.0197	0.0207	0.0202	0.0165	0.0160	0.0174	0.0183	0.0192	0.0197
0.0201	0.0189	0.0203	0.0200	0.0161	0.0155	0.0170	0.0177	0.0191	0.0196
0.0199	0.0199	0.0204	0.0199	0.0162	0.0154	0.0172	0.0170	0.0193	0.0198
0.0199	0.0198	0.0206	0.0203	0.0163	0.0159	0.0174	0.0174	0.0194	0.0195
0.0199	0.0195	0.0204	0.0206	0.0161	0.0163	0.0169	0.0174	0.0196	0.0198
0.0199	0.0201	0.0205	0.0203	0.0162	0.0160	0.0171	0.0170	0.0192	0.0193
Media: 0.0198 S _(n-1) : 0.0003 CV%:1.60%		Media: 0.0204 S _(n-1) : 0.0003 CV%:1.27%		Media: 0.0161 S _(n-1) : 0.0003 CV%:1.87%		Media: 0.0172 S _(n-1) : 0.0005 CV%:2.85%		Media: 0.0195 S _(n-1) : 0.0004 CV%:1.97%	

Tabla 5.29: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interdía correspondiente a los cinco estrógenos conjugados principales.

En el estudio de la precisión para un mismo analista en diferentes días (precisión intermedia interdía) para la estrona se obtiene una media global del factor respuesta 0.0198, mientras que la desviación estándar es de 0.0003 y el coeficiente de variación es de 1.60%. Para la equilina se obtiene una media global del factor respuesta de 0.0204, una desviación estándar de 0.0003 y un coeficiente de variación de 1.27%. Para la 17 α -dihidroequilina se obtiene valor medio para el factor respuesta de 0.0161, una desviación estándar de 0.0003 y un coeficiente de variación de 1.87%. Para la 17 β -dihidroequilina se obtiene un valor medio para el factor respuesta de 0.0172, una desviación estándar de 0.0005 y un coeficiente de variación de 2.85%. Por último se obtiene para el 17 α -estradiol una media global del factor respuesta de 0.0195, una desviación estándar de 0.0004 y un coeficiente de variación de 1.97%. Todos los coeficientes de variación se encuentran por debajo del doble de la repetibilidad del método que se ha fijado como especificación para este ensayo por lo tanto el método posee una buena precisión intermedia interdía.

En las tablas 5.30 se muestran los resultados en la evaluación de la precisión intermedia interdía para las cuatro impurezas. También se presentan los valores de la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA (mismo analista, diferentes días)							
Equilenina		17 α -dihidroequilenina		17 β -dihidroequilenina		17 β -estradiol	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
0.0300	0.0302	0.0291	0.0299	0.0305	0.0284	0.0177	0.0193
0.0306	0.0292	0.0301	0.0297	0.0298	0.0276	0.0189	0.0183
0.0309	0.0282	0.0259	0.0270	0.0290	0.0277	0.0162	0.0199
0.0308	0.0316	0.0293	0.0272	0.0286	0.0283	0.0190	0.0181
0.0303	0.0298	0.0284	0.0260	0.0290	0.0310	0.0188	0.0187
0.0314	0.0295	0.0285	0.0273	0.0306	0.0310	0.0187	0.0178
0.0304	0.0289	0.0293	0.0285	0.0283	0.0292	0.0191	0.0189
0.0296	0.0299	0.0263	0.0272	0.0284	0.0303	0.0185	0.0200
0.0306	0.0298	0.0270	0.0302	0.0281	0.0302	0.0188	0.0193
Media: 0.0301 S _(n-1) : 0.0009 CV%:2.84%		Media: 0.0282 S _(n-1) : 0.0014 CV%:5.14%		Media: 0.0292 S _(n-1) : 0.0011 CV%:3.90%		Media: 0.0187 S _(n-1) : 0.0009 CV%:4.65%	

Tabla 5.30: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interdía correspondiente a las cuatro impurezas.

Se obtiene un valor medio de la respuesta para la equilenina de 0.0301, una desviación estándar de 0.0009 y un coeficiente de variación de 2.84%. Para la 17 α -dihidroequilenina se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.0282, una desviación estándar de 0.0014 y un coeficiente de variación de 5.14%. El valor medio de la respuesta obtenido para la 17 β -dihidroequilenina es de 0.0292, una desviación estándar de 0.0011 y un coeficiente de variación de 3.90%. Por último se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.0187, una desviación estándar de 0.0009 y un coeficiente de variación de 4.65% para la impureza 17 β -estradiol. En todos los casos el coeficiente de variación obtenido está por debajo del doble de la repetibilidad del método obtenida anteriormente, por lo tanto cumple con la especificación inicial y se puede afirmar que el método posee una adecuada precisión intermedia interdía.

En las tablas 5.29 se muestran los resultados en la evaluación de la precisión intermedia interanalista para los cinco estrógenos principales. También se presentan los valores de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA (mismo día, diferentes analistas)									
Estrona		Equilina		17 α -dihidroequilina		17 β -dihidroequilina		17 α -estradiol	
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
0.0196	0.0196	0.0206	0.0207	0.0165	0.0163	0.0160	0.0178	0.0197	0.0199
0.0200	0.0192	0.0209	0.0202	0.0160	0.0157	0.0167	0.0170	0.0188	0.0196
0.0197	0.0195	0.0208	0.0208	0.0159	0.0160	0.0175	0.0167	0.0190	0.0198
0.0201	0.0196	0.0207	0.0210	0.0165	0.0167	0.0174	0.0185	0.0192	0.0201
0.0201	0.0193	0.0203	0.0207	0.0161	0.0159	0.0170	0.0184	0.0191	0.0194
0.0199	0.0193	0.0204	0.0209	0.0162	0.0162	0.0172	0.0170	0.0193	0.0196
0.0199	0.0198	0.0206	0.0203	0.0163	0.0160	0.0174	0.0174	0.0194	0.0195
0.0199	0.0195	0.0204	0.0206	0.0161	0.0160	0.0169	0.0170	0.0196	0.0198
0.0199	0.0201	0.0205	0.0203	0.0162	0.0162	0.0171	0.0177	0.0192	0.0193
Media: 0.0197 $S_{(n-1)}$: 0.0003 CV%: 1.46%		Media: 0.0206 $S_{(n-1)}$: 0.0002 CV%: 1.16%		Media: 0.0162 $S_{(n-1)}$: 0.0002 CV%: 1.52%		Media: 0.0173 $S_{(n-1)}$: 0.0006 CV%: 3.47%		Media: 0.0195 $S_{(n-1)}$: 0.0003 CV%: 1.73%	

Tabla 5.31: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interanalista correspondiente a los cinco estrógenos conjugados principales.

En el estudio de la precisión para un mismo día y diferentes analistas (precisión intermedia interanalista) para la estrona se obtiene una media global del factor respuesta 0.0197, mientras que la desviación estándar es de 0.0003 y el coeficiente de variación es de 1.46%. Para la equilina se obtiene una media global del factor respuesta de 0.0206, una desviación estándar de 0.0002 y un coeficiente de variación de 1.16%. Para la 17 α -dihidroequilina se obtiene valor medio para el factor respuesta de 0.0162, una desviación estándar de 0.0002 y un coeficiente de variación de 1.52%. Para la 17 β -dihidroequilina se obtiene un valor medio para el factor respuesta de 0.0173, una desviación estándar de 0.0006 y un coeficiente de variación de 3.47%. Por último se obtiene para el 17 α -estradiol una media global del factor respuesta de 0.0195, una desviación estándar de 0.0003 y un coeficiente de variación de 1.73%. Todos los coeficientes de variación se encuentran por debajo del doble de la repetibilidad del método que sea fijado como especificación para este ensayo, por lo tanto el método posee una buena precisión intermedia interanalista.

En la tabla 5.32 se muestran los resultados en la evaluación de la precisión intermedia interanalista para los cinco estrógenos principales. También se presentan los valores de la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA (mismo día, diferentes analistas)							
Equilenina		17 α -dihidroequilenina		17 β -dihidroequilenina		17 β -estradiol	
Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
0.0300	0.0292	0.0291	0.0292	0.0305	0.0284	0.0177	0.0193
0.0306	0.0275	0.0301	0.0293	0.0298	0.0283	0.0189	0.0206
0.0309	0.0294	0.0259	0.0306	0.0290	0.0285	0.0162	0.0186
0.0308	0.0303	0.0293	0.0285	0.0286	0.0291	0.0190	0.0189
0.0303	0.0297	0.0284	0.0307	0.0290	0.0298	0.0188	0.0192
0.0314	0.0285	0.0285	0.0285	0.0306	0.0286	0.0187	0.0192
0.0300	0.0294	0.0293	0.0283	0.0283	0.0294	0.0191	0.0197
0.0306	0.0291	0.0263	0.0285	0.0284	0.0321	0.0185	0.0186
0.0309	0.0288	0.0270	0.0296	0.0281	0.0297	0.0188	0.0186
Media: 0.0299 S _(n-1) : 0.0010 CV%: 3.34%		Media: 0.0287 S _(n-1) : 0.0013 CV%: 4.53%		Media: 0.0292 S _(n-1) : 0.0010 CV%: 3.56%		Media: 0.0188 S _(n-1) : 0.0009 CV%: 4.64%	

Tabla 5.32: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interanalista correspondiente a las cuatro impurezas.

Se obtiene un valor medio de la respuesta para la equilenina de 0.0299, una desviación estándar de 0.0010 y un coeficiente de variación de 3.34%. Para la 17 α -dihidroequilenina se obtiene un valor medio para la respuesta de 0.0287, una desviación estándar de 0.0013 y un coeficiente de variación de 4.53%. El valor medio de la respuesta obtenido para la 17 β -dihidroequilenina es de 0.0292, una desviación estándar de 0.0010 y un coeficiente de variación de 3.65%. Por último se obtiene un valor medio de la respuesta de 0.0188, una desviación estándar de 0.0009 y un coeficiente de variación de 4.64% para el 17 β -estradiol. En todos los casos el coeficiente de variación obtenido está por debajo del doble de la repetibilidad del método obtenida anteriormente, por lo tanto cumple con la especificación inicial y se puede afirmar que el método posee una adecuada precisión intermedia interanalista.

Se puede concluir que el método de valoración de los estrógenos conjugados principales y las impurezas posee una adecuada repetibilidad del método y una adecuada precisión intermedia, por lo tanto se puede afirmar que el método analítico propuesto posee una adecuada precisión.

5.4.1.5 Exactitud

En las tablas de 5.33 a la 5.37 se muestran los resultados de la exactitud, en el caso de los cinco estrógenos principales se indican la media, valores mínimo y máximo, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el parámetro estadístico t de Student experimental. Si t_{exp} es inferior a la t teórica, la media obtenida no es estadísticamente diferente al valor teórico (100%). Mientras que en las tablas de 5.38 a la 5.41 se muestra los resultados de exactitud para las cuatro impurezas donde se indican la media, valores mínimo y máximo, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

RESULTADOS EXACTITUD PARA ESTRONA			
Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Concentración hallada (µg/ml)	Recuperación (%)
111.80	2.1946	110.96	99.25
111.80	2.2308	112.75	100.85
111.80	2.2036	111.41	99.65
112.45	2.1928	110.87	98.59
111.33	2.2489	113.65	102.08
112.03	2.2630	114.35	102.07
164.41	3.2965	165.51	100.67
164.41	3.3017	165.77	100.83
164.41	3.2745	164.42	100.01
163.44	3.2198	161.71	98.94
163.95	3.1004	155.80	95.03
163.99	3.2634	163.87	99.93
197.29	3.9311	196.93	99.82
197.29	3.9267	196.71	99.70
197.29	3.9324	196.99	99.85
198.34	3.9271	196.73	99.19
200.32	3.9062	195.70	97.69
197.05	3.9607	198.39	100.68
Media: 99.71% $S_{(n-1)}$: 1.6101 CV: 1.62% Valores mínimo-máximo: 95.03-102.08% t_{exp} : 0.76 $t_{tablas}(\alpha=0.05, gdl=17)$: 2.16			

Tabla 5.33: Resultados de la exactitud correspondiente a la estrona.

En el estudio de la recuperación de estrona se obtiene un valor medio de 99.71% siendo su desviación estándar de 1.6101 y su coeficiente de variación de 1.62%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 95.03%

y 102.08%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 0.76, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 17 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

RESULTADOS EXACTITUD PARA EQUILINA			
Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Concentración hallada (µg/ml)	Recuperación (%)
46.03	0.9472	46.02	99.98
46.03	0.9632	46.80	101.68
46.03	0.9554	46.42	100.85
45.76	0.9427	45.80	100.09
43.87	0.8906	43.26	98.60
46.25	0.9481	46.07	99.60
78.91	1.6343	79.56	100.82
78.91	1.6054	78.15	99.03
78.91	1.6114	78.44	99.40
76.87	1.5528	75.58	98.32
80.15	1.6030	78.03	97.35
78.21	1.5564	75.75	96.86
105.22	2.1708	105.74	100.49
105.22	2.1508	104.76	99.57
105.22	2.1579	105.11	99.89
107.02	2.1725	105.82	98.88
104.76	2.1581	105.12	100.34
106.14	2.1546	104.95	98.88
Media: 99.48% $S_{(n-1)}$: 1.2258 CV: 1.23% Valores mínimo-máximo: 97.35-101.68% t_{EXP} : 1.79 $t_{tablas}(\alpha=0.05, gdl=16)$: 2.16			

Tabla 5.34: Resultados obtenidos en la recuperación para la equilina.

En el estudio de la recuperación de equilina se obtiene un valor medio de 99.48% siendo su desviación estándar de 1.2258 y su coeficiente de variación de 1.23%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 97.35% y 101.68%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del

parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 1.79, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 16 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 α -dihidroequilina			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
28.94	0.4769	29.54	102.07
28.94	0.4634	28.71	99.21
28.94	0.4593	28.46	98.34
27.43	0.4471	27.71	101.04
29.03	0.4761	29.49	101.58
28.34	0.4619	28.62	101.00
52.61	0.8658	53.35	101.41
52.61	0.8450	52.08	98.99
52.61	0.8508	52.43	99.67
51.23	0.8197	50.53	98.63
54.93	0.8514	52.47	95.53
46.87	0.7218	44.54	95.02
78.91	1.2832	78.91	100.00
78.91	1.2694	78.07	98.93
78.91	1.2755	78.44	99.41
80.51	1.2801	78.72	97.78
77.56	1.2642	77.75	100.25
79.15	1.2664	77.88	98.40
Media: 99.29% $S_{(n-1)}$: 1.9103 CV: 1.92% Valores mínimo-máximo: 95.02-102.07% t_{EXP} : 1.56 $t_{\text{tablas}}(\alpha=0.05, \text{gdl}=16)$: 2.16			

Tabla 5.35: Resultados obtenidos en la exactitud correspondiente a la 17 α -dihidroequilina.

En el estudio de la recuperación de 17 α -dihidroequilina se obtiene un valor medio de 99.29% siendo su desviación estándar de 1.9103 y su coeficiente de variación de 1.92%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 95.02% y 102.07%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 1.56, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del

95% y 16 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 β -dihidroequilina			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
0.99	0.0167	0.96	97.19
0.99	0.0165	0.95	96.02
0.99	0.0173	1.00	100.72
1.12	0.0188	1.09	96.90
1.03	0.0179	1.03	100.32
1.14	0.0194	1.12	98.08
5.92	0.1033	6.00	101.35
5.92	0.1007	5.85	98.80
5.92	0.1021	5.93	100.17
6.09	0.1023	5.94	97.58
5.96	0.0983	5.71	95.83
6.11	0.1075	6.25	102.23
13.81	0.2408	14.00	101.37
13.81	0.2339	13.60	98.46
13.81	0.2356	13.70	99.18
12.07	0.2028	11.79	97.65
14.59	0.2626	15.27	104.65
13.66	0.2281	13.26	97.08
Media: 99.09% $S_{(n-1)}$: 2.3611 CV: 2.38% Valores mínimo-máximo: 95.85-104.65% t_{EXP} : 1.63 $t_{\text{tablas}}(\alpha=0.05, \text{gdl}=17)$: 2.16			

Tabla 5.36: Resultados obtenidos en la exactitud correspondiente a al 17 β -dihidroequilina.

En el estudio de la recuperación de 17 β -dihidroequilina se obtiene un valor medio de 99.09% siendo su desviación estándar de 2.3611 y su coeficiente de variación de 2.38%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 95.85% y 104.65%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 1.63, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 17 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 α -estradiol			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
2.30	0.0452	2.40	104.53
2.30	0.0432	2.30	100.04
2.30	0.0436	2.32	100.94
2.43	0.0450	2.39	98.42
2.24	0.0430	2.29	102.28
2.37	0.0431	2.30	96.94
13.81	0.2645	13.73	99.39
13.81	0.2639	13.69	99.17
13.81	0.2664	13.82	100.10
14.73	0.2902	15.05	102.18
13.56	0.2658	13.79	101.71
14.03	0.2778	14.41	102.72
32.22	0.6236	32.26	100.14
32.22	0.6310	32.65	101.32
32.22	0.6196	32.06	99.50
30.89	0.6024	31.17	100.90
31.67	0.6271	32.44	102.44
33.03	0.6375	32.98	99.85
Media: 100.70% $S_{(n-1)}$: 1.7932 CV: 1.78% Valores mínimo-máximo: 98.42-104.53% t_{EXP} : 1.67 $t_{\text{tablas}}(\alpha=0.05, \text{gdl}=17)$: 2.16			

Tabla 5.37: Resultados obtenidos para la exactitud correspondiente al 17 α -estradiol.

En el estudio de la recuperación de 17 α -estradiol se obtiene un valor medio de 100.70% siendo su desviación estándar de 1.7932 y su coeficiente de variación de 1.78%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 98.42% y 104.53%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 1.67, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 17 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

Se puede concluir que la recuperación de los cinco estrógenos principales para la metodología analítica desarrollada cumple con las especificaciones y es correcta, por lo tanto el método presenta una buena exactitud.

RESULTADOS EXACTITUD PARA Equilenina			
Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Concentración hallada (µg/ml)	Recuperación (%)
2.63	0.0790	2.47	93.93
2.63	0.0806	2.52	95.99
2.63	0.0812	2.55	96.77
2.74	0.0827	2.60	94.81
3.04	0.0888	2.80	92.18
2.86	0.0807	2.53	88.34
13.15	0.4051	13.56	103.11
13.15	0.3984	13.33	101.37
13.15	0.4123	13.80	104.97
12.76	0.4032	13.49	105.75
13.80	0.4112	13.77	99.76
13.51	0.3985	13.34	98.71
22.56	0.6850	23.08	102.28
22.56	0.6678	22.49	99.69
22.56	0.6900	23.25	103.04
20.98	0.6063	20.40	97.24
21.65	0.6473	21.79	100.67
23.85	0.7107	23.95	100.42
Media: 98.84% $S_{(n-1)}$: 4.5819 CV:4.64% Valores mínimo-máximo:88.34-105.75%			

Tabla 5.38: Resultados obtenidos para la exactitud correspondiente a la equilenina.

En el estudio de la recuperación de equilenina se obtiene un valor medio de 98.84% siendo su desviación estándar de 4.5819 y su coeficiente de variación de 4.64%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 88.34% y 105.75%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 80%-120%. Los resultados cumplen con las especificaciones por lo tanto se puede concluir que la exactitud para la equilenina del método analítico es adecuada.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 α -dihidroequilenina			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
1.38	0.0393	1.36	98.74
1.36	0.0370	1.27	93.65
1.35	0.0408	1.41	104.77
1.36	0.0385	1.33	97.48
1.37	0.0391	1.35	98.50
1.35	0.0400	1.38	102.40
1.34	0.0401	1.39	103.39
1.35	0.0401	1.39	103.08
1.35	0.0364	1.25	92.96
1.35	0.0367	1.26	93.49
1.39	0.0361	1.24	89.21
1.37	0.0374	1.29	93.89
Media: 97.63% $S_{(n-1)}$: 5.0299 CV: 5.15% Valores mínimo-máximo: 89.21-104.77%			

Tabla 5.39: Resultados obtenidos para la exactitud correspondiente a la 17 α -dihidroequilenina.

En el estudio de la recuperación de 17 α -dihidroequilenina se obtiene un valor medio de 97.63% siendo su desviación estándar de 5.0299 y su coeficiente de variación de 5.15%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 89.21% y 104.77%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 80%-120%. Los resultados cumplen con las especificaciones por lo tanto se puede concluir que la exactitud para 17 α -dihidroequilenina del método analítico es adecuada.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 β -dihidroequilenina			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
0.66	0.0201	0.6158	93.31
0.66	0.0197	0.6011	91.07
0.66	0.0191	0.5813	88.08
0.74	0.0210	0.6481	87.58
0.65	0.0179	0.5398	83.04
0.68	0.0188	0.5713	84.02
3.95	0.1129	3.8835	98.32
3.95	0.1145	3.9398	99.74
3.95	0.1208	4.1616	105.36
4.23	0.1197	4.1232	97.48
3.89	0.1206	4.1542	106.79
4.03	0.1249	4.3070	106.87
9.21	0.2609	9.0947	98.75
9.21	0.2618	9.1264	99.09
9.21	0.2589	9.0243	97.98
9.33	0.2724	9.5009	101.83
9.50	0.2879	10.0437	105.72
9.50	0.2869	10.0102	105.37
Media: 97.25% $S_{(n-1)}$: 7.7832 CV: 8.00% Valores mínimo-máximo: 83.04-106.87%			

Tabla 5.40: Resultados obtenidos para la exactitud correspondiente 17 β -dihidroequilenina.

En el estudio de la recuperación de 17 β -dihidroequilenina se obtiene un valor medio de 97.25% siendo su desviación estándar de 7.7832 y su coeficiente de variación de 8.00%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 83.04% y 106.87%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 80%-120%. Los resultados cumplen con las especificaciones por lo tanto se puede concluir que la exactitud para 17 β -dihidroequilenina del método analítico es adecuada.

RESULTADOS EXACTITUD PARA 17 β -estradiol			
Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta	Concentración hallada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
0.53	0.0117	0.52	98.27
0.53	0.0110	0.48	91.49
0.53	0.0107	0.47	88.59
0.62	0.0120	0.53	86.20
0.60	0.0110	0.48	80.65
0.58	0.0115	0.51	88.40
3.75	0.0751	3.77	100.59
3.75	0.0743	3.73	99.50
3.75	0.0738	3.71	98.81
3.40	0.0615	3.08	90.49
3.88	0.0726	3.64	93.86
3.51	0.0625	3.12	89.03
9.02	0.1755	8.92	98.90
9.02	0.1765	8.97	99.47
9.02	0.1800	9.15	101.46
8.80	0.1663	8.45	96.02
9.21	0.1842	9.37	101.70
9.10	0.1756	8.93	98.10
Media: 94.53% $S_{(n-1)}$: 6.14893 CV: 6.51% Valores mínimo-máximo: 80.65-101.70%			

Tabla 5.41: Resultados obtenidos para la exactitud correspondiente a el 17 β -estradiol.

En el estudio de la recuperación de 17 β -estradiol se obtiene un valor medio de 94.53% siendo su desviación estándar de 6.14893 y su coeficiente de variación de 6.51%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 80.65% y 101.70%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 80%-120%. Los resultados cumplen con las especificaciones por lo tanto se puede concluir que la exactitud para 17 β -estradiol del método analítico es adecuada.

Se puede concluir que la recuperación obtenida de las impurezas para la metodología analítica desarrollada cumple con las especificaciones iniciales, por lo tanto el método presenta una adecuada exactitud.

5.4.1.6 Límite de cuantificación y límite de detección

En las condiciones analíticas utilizadas, el software de adquisición y proceso de datos utilizado (Millenium 32) es capaz de calcular la mínima cantidad detectable y cuantificable mediante la relación de altura de pico y ruido de la línea de base.

En la tabla 5.40 se muestran los límites de detección y cuantificación de cada uno de los estrógenos conjugados y el límite que debe cuantificarse según la RFE 3^{era} Ed. y Ph. Eur. 5^a Ed. Los límites están expresados como porcentaje respecto a la cantidad de estrógenos totales de la materia prima.

Estrógeno conjugado	Límite de detección	Límite de cuantificación	Límites RFE y Ph. Eur.
Estrona sulfato sódico	0.03%	0.10%	52.5-61.5%
Equilina sulfato sódico	0.03%	0.10%	22.5-30.5%
17 α -estradiol sulfato sódico	0.02%	0.08%	2.5-9.5%
17 α -dihidroequilina sulfato sódico	0.02%	0.08%	13.5-19.5%
17 β -dihidroequilina sulfato sódico	0.02%	0.07%	0.5-4.0%
17 α -dihidroequilenina sulfato sódico	0.01%	0.04%	Inferior a 3.25%
17 β -dihidroequilenina sulfato sódico	0.01%	0.04%	Inferior a 2.75%
17 β -estradiol sulfato sódico	0.02%	0.07%	Inferior a 2.25%
Equilenina sulfato sódico	0.02%	0.05%	Inferior a 5.5%

Tabla 5.42: Límites de detección y cuantificación obtenidos para los estrógenos conjugados y los límites establecidos por las farmacopeas.

Las cantidades obtenidas para el límite de cuantificación están todas muy alejadas de los límites que debe cumplir la materia prima según la RFE (82) y Ph. Eur. (83), por lo tanto se cumplen las especificaciones indicadas al inicio de la validación para este parámetro.

5.4.2 Resultados de la Validación del método analítico para la valoración del producto acabado

En la tabla 5.42 se muestran los límites para considerar correcta la validación del método.

Parámetro de la validación	Ensayo o prueba estadística	Bibliografía	Criterio de aceptación
Selectividad	Ausencia de interferencias	AEFI 2001	Ausencia
Linealidad	Coeficiente de correlación r	AEFI 2001	$r > 0.9990$
	Coeficientes de variación de las repuestas	AEFI 2001	Inferior a 5%
	Significación estadística de la pendiente	AEFI 2001	$t_{exp} > 2.16$ Intervalo de confianza no debe incluir el cero
	Test de proporcionalidad	AEFI 2001	$t_{exp} < 2.16$ Intervalo de confianza debe incluir al cero.
	Análisis de la varianza	AEFI 2001	p-valor de F_1 inferior a 0.05 p-valor de F_2 superior a 0.05
Rango	Intervalo de concentración con correcta linealidad exactitud y precisión	AEFI 2001	Mínimo 80 a 120% concentración de trabajo
Exactitud	T de Student	AEFI 2001	$t_{exp} < 2.042$
	Recuperaciones	AEFI 2001	97-103%
Precisión	Repetibilidad sistema instrumental	AOAC	Inferior 1%
	Repetibilidad solución patrón		Inferior 2.7%
	Repetibilidad del método		Inferior 2.7%
	Precisión intermedia		Inferior 2.7%

Tabla 5.43: Especificaciones para considerar la validación correcta.

5.4.2.1 Idoneidad del sistema

En la figura 5.23 se observa el cromatograma de la solución estándar donde aparecen los tres picos identificados que corresponden con las sustancias estudiadas. En la tabla se muestran las áreas, los tiempos de retención y la resolución de los picos para evaluar la precisión del sistema cromatográfico.

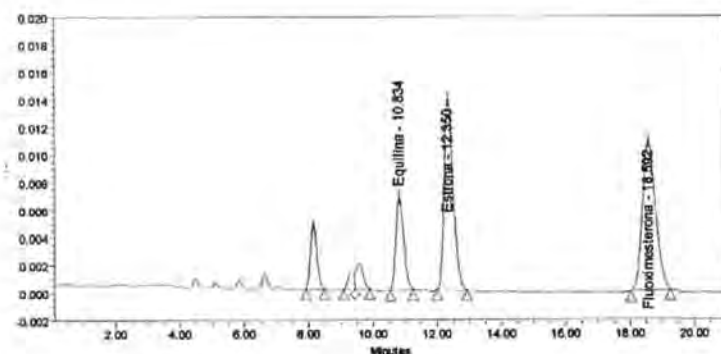


Figura 5.23: Cromatograma correspondiente a la solución de estándar.

Sustancia	Tiempo de retención (min)	Área	Resolución
Equilina sulfato sódica	10.834	115334	2.83
	10.802	120032	2.85
	10.882	116865	2.83
	10.850	118656	2.84
	10.823	117545	2.86
	Media: 10.838 min CV: 0.28%	Media: 116351 CV: 1.10%	Media: 2.84 CV: 0.46%
Estrona sulfato sódica	12.350	273998	3.17
	12.393	273003	3.19
	12.345	275634	3.17
	12.384	274545	3.16
	12.375	274434	3.19
	Media: 12.369 min CV: 0.17%	Media: 274323 CV: 0.35%	Media: 3.18 CV: 0.42%
Fluoximesterona	18.592	311151	9.87
	18.632	308976	9.92
	18.653	310983	9.91
	18.589	309821	9.89
	18.612	311112	9.88
	Media: 18.616 min CV: 0.15%	Media: 310409 CV: 0.31%	Media: 9.89 CV: 0.21%
Límite	CV<1%	CV<2%	CV<1%

Tabla 5.44: Resultados de idoneidad de los picos estudiados.

En cuanto a los parámetros cromatográficos se obtiene que el factor de capacidad del pico que corresponde a la equilina de 9.8, el factor de capacidad para la estrona es de 11.3 y el factor de capacidad para la fluoximesterona es de 17.6, tal y como queda reflejado en la figura 5.24. En cuanto a los platos teóricos obtenidos para los tres picos en orden de elución son de 9038, 8767 y 9867. Por otro lado los parámetros de asimetría de los picos estudiados aportan los siguientes resultados en orden de elución: 1.21, 1.31 y 1.14. Por último se estudia la resolución entre picos próximos, en el caso de la equilina y el pico anterior más próximo se obtiene una resolución de 2.83; la resolución entre la equilina y la estrona es de 3.17. La resolución entre la fluoximesterona y estrona es de 9.87 tal y como queda reflejado en la figura 5.24.

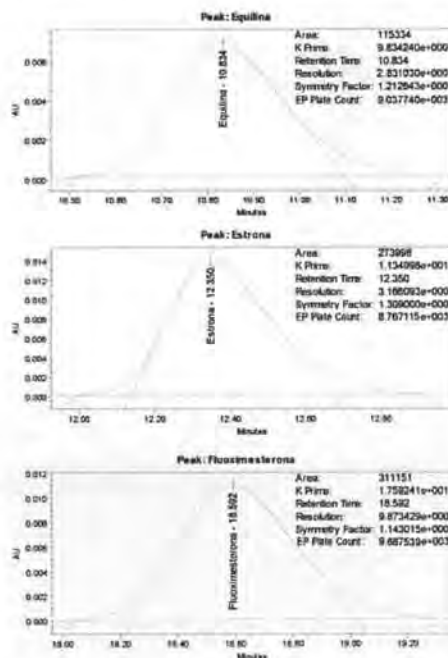


Figura 5.24: Estudio de idoneidad de los picos.

Se puede concluir que el método desarrollado es óptimo si se tiene en cuenta los parámetros cromatográficos estudiados ya que por un lado los parámetros de precisión para el tiempo de retención, área y la resolución se encuentran por debajo de los establecidos al inicio de la validación. Por otro lado los valores del factor de capacidad para los tres picos en consideración son superiores a 2. Mientras que el número de platos teóricos hallados para los picos superan ampliamente el valor mínimo fijado de 2000. En cuanto al factor de simetría de los picos estudiados se encuentra dentro de los límites establecidos. Por último, la resolución entre dos picos consecutivos en el método desarrollado supera el mínimo para considerar que existe una buena separación entre los mismos. En consecuencia se puede decir que se ha demostrado que este método se puede aplicar en rutina y es totalmente idóneo.

5.4.2.2 Selectividad

5.4.2.2.1 Identificación del principio activo

En la figura 5.25 y 5.26 se observan los cromatogramas del estándar y problema (sin estándar interno) donde aparecen 2 picos a 10.822 minutos y 12.329 minutos mientras que en el cromatograma del estándar de secundario se observan dos picos a 10.834 minutos y a 12.350 minutos identificados como estrona y equilina. Se observa un perfil semejante entre el cromatograma del problema y el estándar secundario, por lo que se

puede concluir que la identificación del analito en el problema respecto al estándar secundario es positiva.

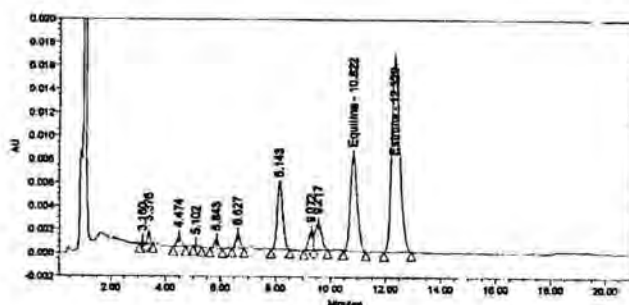


Figura 5.25: Cromatograma de solución problema

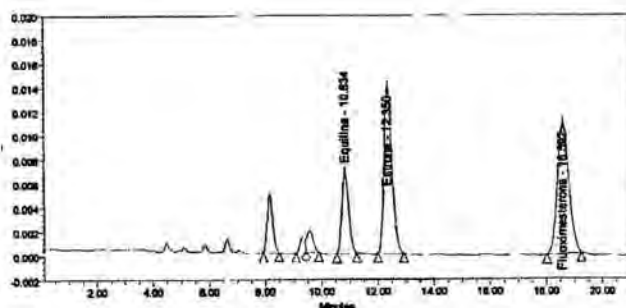


Figura 5.26: cromatograma de la solución estándar

Por otro lado a los picos de equilina y estrona de ambos cromatogramas se les realiza un estudio de pureza de pico (en la figura 5.27 y 5.28) indicando que los espectros tomados a diferentes tiempos se encuentran por debajo del umbral (en la figura 5.26) establecido por el sistema en consideración al ruido del aparato y el ángulo del solvente. Se concluye por lo tanto que el pico de la equilina y estrona son únicos sin interferencia de ningún pico que pudiera eluir en el mismo tiempo, por lo tanto se trata de un método selectivo.

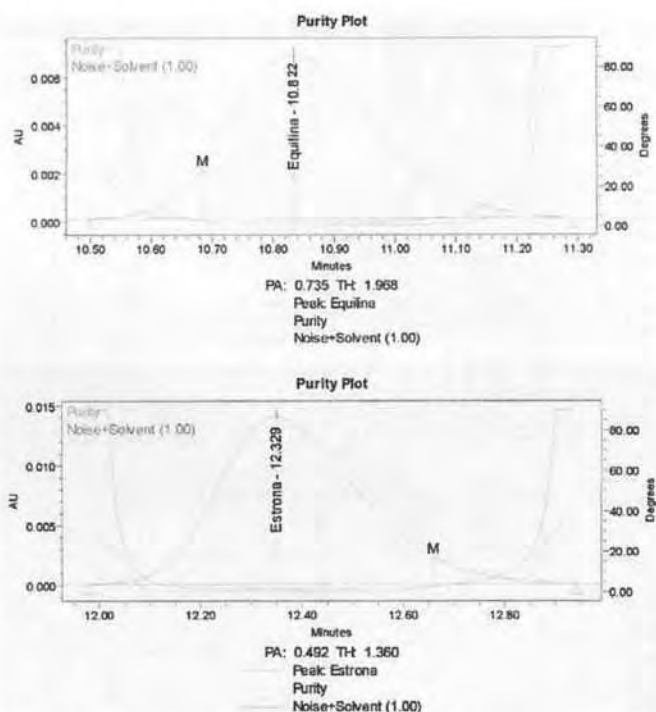


Figura 5.27: Estudio de pureza de los picos de estrona y equilina para la solución problema.

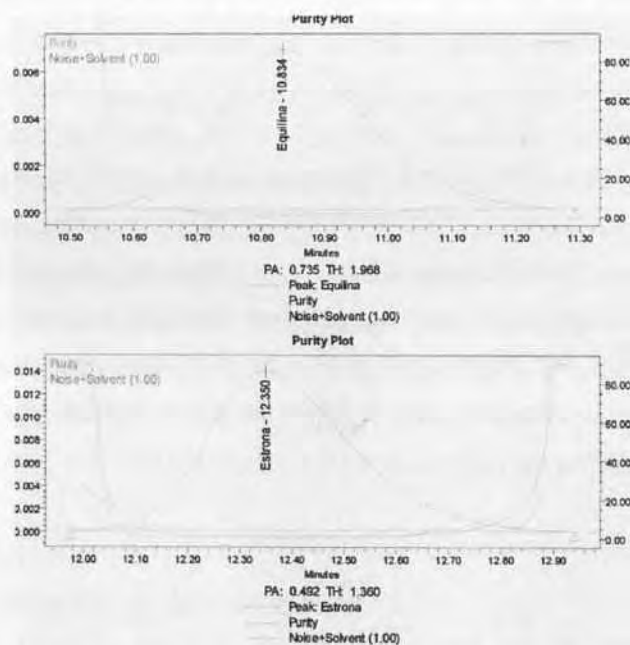


Figura 5.28: Estudio de pureza de los picos de estrona y equilina para la solución estándar.

5.4.2.2.2 Ausencia de interferencias del estándar interno

En la figura 5.29 se muestra la solución de estándar interno donde se observa un pico que eluye a 18.607 que corresponde a la fluoximesterona. La zona de elución del estándar interno no se ve interferida por ningún pico que se haya observado en las soluciones del apartado de selectividad.

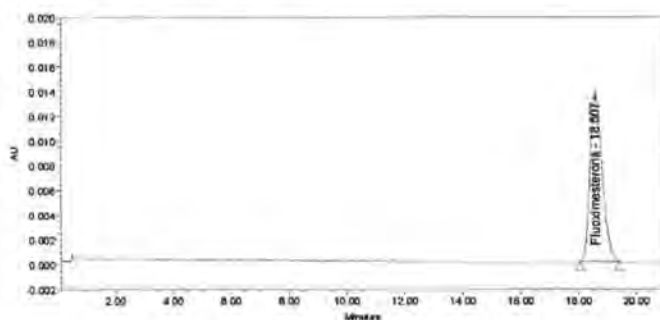


Figura 5.29: Cromatograma correspondiente al estándar interno.

5.4.2.2.3 Ausencia de interferencias de los excipientes

En la figura 5.30 se muestra el cromatograma correspondiente a la solución placebo donde se observa la presencia de un pico en el frente del cromatograma aproximadamente a 1.2 minutos. El pico debido a los excipientes no supone una interferencia en el método ya que se encuentra en el frente alejado de los picos debidos a la materia prima, por lo tanto se puede concluir que el método es selectivo con respecto a los excipientes de la formulación.

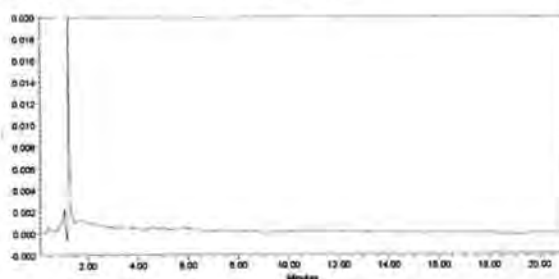


Figura 5.30: Cromatograma correspondiente al placebo.

5.4.2.2.4 Muestra sometida a stress

La figura 5.31 corresponde al cromatograma obtenido en las soluciones preparadas con muestras de los comprimidos sometidos a 100 °C. Se puede observar que el método continúa separando los picos de la estrona y equilina sin interferencias aunque se observa un cambio en el perfil del restos de picos y la desaparición del pico que eluye alrededor de 8.1 minutos que es debido a la 17 α -dihidroequilina que consiste en

un estrógeno conjugado marcador de la estado de conservación de los estrógenos conjugados. Por lo tanto se puede concluir que ninguno de los picos que se pueden generar en condiciones extremas interfiere en la valoración del contenido de equilina sulfato sódica y estrona sulfato sódica.

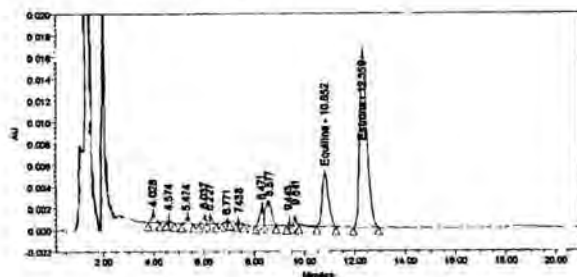


Figura 5.31: Cromatograma correspondiente a la muestra estresada.

En conclusión se puede afirmar que el método utilizado en la valoración de la equilina sulfato sódico y estrona sulfato sódico en las formulaciones es un método selectivo y apto para utilizar de forma rutinaria.

5.4.2.3 Linealidad del método

5.4.2.3.1 Linealidad de la estrona sulfato sódico

Los resultados del estudio de linealidad se muestran en la tabla 5.44 donde se indica las concentraciones de los cinco niveles, la respuesta (relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y el factor respuesta (relación entre respuesta y concentración). También se indican la media del factor respuesta, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta de regresión. En la figura 5.32 se muestra la representación gráfica de la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la estrona sulfato sódico.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE ESTRONA SULFATO SÓDICO				
Analista A	CONCENTRACIÓN (X) µg/ml		RESPUESTA (Y)	FACTOR RESPUESTA (Y/X)
	Nivel 50%	7.9248	0.4572	0.0577
		7.9248	0.4354	0.0549
		7.9248	0.4568	0.0576
	Nivel 75%	11.8871	0.6913	0.0582
		11.8871	0.6936	0.0583
		11.8871	0.6756	0.0568
	Nivel 100%	15.8496	0.9069	0.0572
		15.8496	0.9132	0.0576
		15.8496	0.8962	0.0565
	Nivel 125%	19.8119	1.1608	0.0586
		19.8119	1.1625	0.0587
		19.8119	1.1542	0.0583
	Nivel 150%	23.7742	1.3780	0.0580
		23.7742	1.3880	0.0584
		23.7742	1.3610	0.0572
Ecuación de la recta: y(respuesta)=0.05865 x (concentración) - 0.01425				
r=0.9994 r²=0.9987			Media factor respuesta= 0.05761 CV%=1.69%	

Tabla 5.45: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a la estrona sulfato sódico.

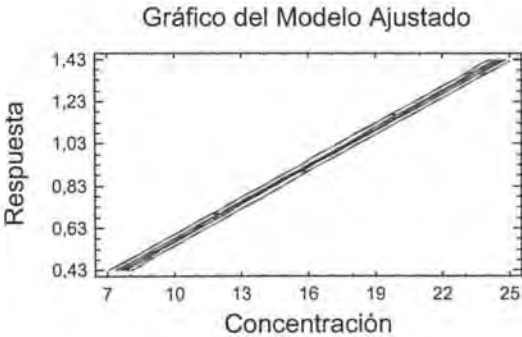


Figura 5.32: Representación gráfica de la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la estrona sulfato sódico.

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA ESTRONA SULFATO SÓDICO					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 106.553 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.05747 a 0.05984		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 1.54005 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.034240 a 0.005737		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.350948 p-valor: 0.887337 Contraste de Bartlett: 1.2787 p-valor: 0.726805			Contraste de Hartley: 9.69308 Test de Levene: 0.235592 p-valor: 0.911933		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 1.33333E-9 Varianza = 0.000132526 Desviación típica = 0.011512			Mínimo = -0.019191 Máximo = 0.0147122 Rango = 0.0339032 Asimetría tipificada. = -0.872005* Curtosis tipificada = -0.832309*		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	1.62039	1	1.62039	F ₁ =11353.60	0.0000*
Residuos	0.00185536	13	0.00014272		
Falta de ajuste	0.000793474	3	0.000264491	F ₂ =2.49	0.1199**
Error puro	0.00106189	10	0.000106189		
Total (Correlación)	1.62224	14			
*Valores de P-valores inferiores o iguales a 0.05 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.05 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.46: Resultados obtenidos en el estudio estadístico de la linealidad correspondiente estrona.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.05865x - 0.01425$, siendo el coeficiente de correlación 0.9994, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.87% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.05761, siendo el coeficiente de variación porcentual 1.69%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta (0.05865), lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y la respuesta. El valor del coeficiente de variación es

inferior al 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo, lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental es superior a la t teórica indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de confianza de la pendiente no incluye el cero. En cuanto al test de proporcional, se observa que la t experimental es menor a la t teórica (13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente de cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen. Por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero.

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran; el valor de p-valor representa el máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.887337) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración, por tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de -0.872 y 0.832, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p-valor obtenido para F_1 es inferior al nivel de significación del 0.05, lo que indica que la pendiente es significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 es superior a 0.05, lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Con todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de estrona sulfato sódico entre el 50% y el 150% de la concentración de trabajo.

5.4.2.3.2 Linealidad de la equilina sulfato sódico

Los resultados del estudio de linealidad para la equilina sulfato sódico se muestran en la tabla 5.46 donde se indican las concentraciones de los cinco niveles, las respuestas

(relación entre el área del analito y el área del estándar interno) y los factores respuesta (relación entre la respuesta y concentración). En esta misma tabla se indican la media del factor respuesta, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la ecuación de la recta. Por otro lado también se presenta el estudio estadístico de los resultados obtenidos en la tabla 5.47. En la figura 5.33 se muestra la representación gráfica de la linealidad correspondiente a la equilina sulfato sódico.

RESULTADOS DE LINEALIDAD DE EQUILINA SULFATO SÓDICO				
Analista A	Concentración (X) µg/ml		Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
	Nivel 50%	3.6529	0.2231	0.0611
		3.6529	0.2232	0.0611
		3.6529	0.2219	0.0607
	Nivel 75%	5.4793	0.3352	0.0612
		5.4793	0.3375	0.0616
		5.4793	0.3280	0.0599
	Nivel 100%	7.3057	0.4403	0.0603
		7.3057	0.4440	0.0608
		7.3057	0.4351	0.0596
	Nivel 125%	9.1321	0.5628	0.0616
		9.1321	0.5634	0.0617
		9.1321	0.5601	0.0613
	Nivel 150%	10.9586	0.6686	0.0610
		10.9586	0.6500	0.0593
		10.9586	0.6654	0.0615
Ecuación de la recta: Y(respuesta)=0.060541 X(concentración)+0,00161099				
r=0.9992 r²=0.9985			Media factor respuesta= 0.06079 CV%=1.22%	

Tabla 5.47: Resultados y recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilina sulfato sódico.

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA EQUILINA SULFATO SÓDICO					
Significación estadística de la pendiente					
t _{experimental} = 92.2164 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: 0.05912 a 0.06196		
Test de proporcionalidad					
t _{experimental} = 0.316675 t _{tablas} = 2.16			Intervalo de confianza: -0.00938 a 0.01260		
Test de homogeneidad de las variancias					
Contraste C de Cochran: 0.672469 P-valor = 0.0575411 Contraste de Bartlett: 3.08691 P-valor = 0.0519911			Contraste de Hartley: 188.968 Test de Levene: 0.849817 P-valor = 0.5252		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Test de normalidad de residuales					
Frecuencia = 15 Media = 0.00000000946667 Varianza = 0.0000400516 Desviación típica = 0.00632864			Mínimo = -0.0150557 Máximo = 0.00892244 Rango = 0.0239781 Asimetría típi. = -1.39154 Curtosis tipificada = 0.864121		
*valores entre -2 y 2 se considera que los residuales siguen una distribución normal y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Análisis de la variancia con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Modelo	0.366794	1	0.366794	F ₁ =8503.87	0.0000
Residuos	0.000560723	13	0.0000431326		
Falta de ajuste	0.000266603	3	0.0000888677	F ₂ =3.02	0.0805
Error puro	0.00029412	10	0.000029412		
Total (Correlación)	0.367354	14			
*Valores de P-valor inferiores o iguales a 0.1 indican que la pendiente es significativamente distinta de cero. **Valores de P-valor mayores o iguales a 0.1 indican que existe una buena linealidad entre los resultados.					

Tabla 5.48: Estudio estadístico de los resultados de la linealidad correspondiente a la equilina sulfato sódico.

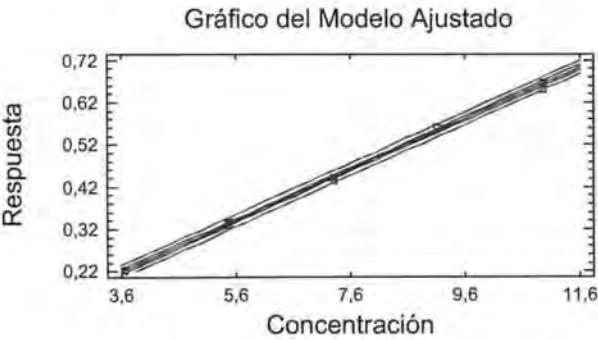


Figura 5.33: Representación gráfica de la recta de regresión de la linealidad correspondiente a la equilina sulfato sódico.

La ecuación de la recta obtenida relacionando la concentración y la respuesta corresponde a $y = 0.060541x + 0.00161099$ siendo el coeficiente de correlación 0.9992, valor superior a 0.9990 establecido al inicio del ensayo. Por otro lado el coeficiente de determinación indica que el modelo explica el 99.85% de la variación total de la respuesta y.

En el estudio del factor respuesta, se obtiene una media de 0.06079, siendo el coeficiente de variación porcentual 1.22%. La media no difiere mucho del valor obtenido para la pendiente de la recta, lo que refleja una buena correlación lineal entre la concentración y respuestas. El valor del coeficiente de variación es inferior 2%, valor límite establecido al inicio del ensayo, lo que indica una buena linealidad.

Del estudio estadístico de la significación estadística de la pendiente, se desprende que la t experimental es superior a la t teórica indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre cero y la pendiente de la recta indicando una correlación lineal y por ello el intervalo de la confianza de la pendiente no incluye el cero. En cuanto al test de proporcional, se observa que la t experimental es menor a la t teórica (13 gdl, $\alpha=0.05$) lo que indica que el término independiente no es estadísticamente diferente de cero y se puede considerar que la recta pasa por el origen, por lo tanto el límite de confianza del término independiente incluye el cero.

Para poder aplicar un análisis de la variancia se debe cumplir el test de homogeneidad de las variancias y test de normalidad. El test de homogeneidad de las variancias utilizado consiste en un test de contraste de Cochran; el valor de p -valor representa el máximo nivel de significación para considerar que hay diferencias estadísticamente significativas. Como el valor obtenido (0.0575411) es mayor que el nivel de significación generalmente usado de 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración por tanto se cumple la homogeneidad de las variancias. También se realiza un test de normalidad de los residuos y se obtienen unos valores de asimetría tipificada y curtosis tipificada de -0.872 y 0.832, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo entre -2 y 2 lo que indica que los residuales siguen una distribución normal. Al cumplir los dos últimos test, se puede aplicar a los resultados un análisis de la variancia (ANOVA). Del estudio de ANOVA se obtiene que p -valor obtenido para F_1 es inferior al nivel de significación del 0.05 lo que indica que la pendiente es

significativamente distinta a cero. El p-valor obtenido para F_2 es superior a 0.05 lo que indica que no existe falta de ajuste y demuestra que existe una buena linealidad entre los resultados. Por todo ello, se puede concluir que la metodología analítica propuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de equilina sulfato sódico entre el 50% y el 150% de la concentración de trabajo.

5.4.3 Resultados y discusión de la precisión

5.4.3.1 Repetibilidad del sistema instrumental

En la tabla 5.49 se resumen los resultados para el tiempo de retención y la respuesta para la estrona sulfato sódico y la equilina sulfato sódico para el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental. También se presenta la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

RESULTADOS DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA INSTRUMENTAL				
Número de inyección	Estrona sulfato sódico		Equilina sulfato sódico	
	Tiempo de retención (min)	Respuesta	Tiempo de retención (min)	Respuesta
1	12.334	0.9134	10.832	0.4472
2	12.314	0.9010	10.844	0.4461
3	12.327	0.9041	10.792	0.4446
4	12.298	0.9098	10.798	0.4408
5	12.305	0.9009	10.825	0.4441
6	12.319	0.9076	10.835	0.4468
7	12.331	0.9083	10.840	0.4440
8	12.320	0.9055	10.842	0.4450
9	12.322	0.9032	10.817	0.4492
10	12.335	0.9046	10.813	0.4467
Media:	12.321	0.9058	10.824	0.4455
$S_{(n-1)}$:	0.0122	0.0039	0.0184	0.0023
CV(%):	0.10%	0.44%	0.17%	0.52%

Tabla 5.49: Resultados de la repetibilidad del método instrumental.

El valor medio de la respuesta de la estrona sulfato sódico es de 0.9058, la desviación estándar corresponde a 0.0039 y el coeficiente de variación es de 0.44%. El valor medio del tiempo de retención para la estrona sulfato sódico es de 12.321 minutos, la desviación estándar corresponde a 0.0122 minutos y presenta un coeficiente de variación de 0.10%. Para la equilina sulfato sódico se obtiene un valor medio de la respuesta de 0.4455, la desviación estándar corresponde a 0.0023 y presenta un

coeficiente de variación de 0.52% mientras que para el tiempo de retención presenta un valor promedio de 10.824 minutos, una desviación estándar de 0.0184 minutos y presenta un coeficiente de variación de 0.17%.

En todos los casos el coeficiente de variación obtenido está por debajo del límite establecido para el estudio de la repetibilidad del sistema instrumental, demostrando que el equipo utilizado para desarrollar el método analítico funciona perfectamente y es altamente repetitivo.

5.4.3.2 Repetibilidad de la solución de estándar

En la tabla 5.50 se encuentran los resultados obtenidos en la repetibilidad de la solución estándar para la estrona sulfato sódico y la equilina sulfato sódico juntamente con el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para el factor respuesta.

RESULTADOS REPETIBILIDAD DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR							
Estrona sulfato sódico				Equilina sulfato sódico			
	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	
1	15.8011	0.9174	0.0581	7.2833	0.4467	0.0613	
2	15.9673	0.9234	0.0578	7.3599	0.4613	0.0627	
3	15.7670	0.9052	0.0574	7.2676	0.4567	0.0628	
4	15.9206	0.9153	0.0575	7.3384	0.4522	0.0616	
5	16.0431	0.9312	0.0580	7.3948	0.4689	0.0634	
6	16.1082	0.9462	0.0587	7.4248	0.4704	0.0634	
Media:			0.0579	Media:			0.0625
S _(n-1) :			0.0005	S _(n-1) :			0.0010
CV(%):			0.81%	CV(%):			1.43%

Tabla 5.50: Resultados obtenidos en la repetibilidad de la solución estándar.

La media obtenida para el factor respuesta de la estrona sulfato sódico es de 0.0579 mientras que la desviación estándar y el coeficiente de variación son 0.0005 y 0.81%, respectivamente. En el caso de la equilina sulfato sódico, se obtiene un valor promedio de 0.0625 mientras que la desviación estándar y el coeficiente de variación son 0.0010 y 1.43%, respectivamente.

Los valores del coeficiente de variación para ambas sustancias se encuentra por debajo del límite indicado al inicio del estudio (2.7%) por lo que el método analítico propuesto posee una buena repetibilidad para la solución estándar.

5.4.3.3 Repetibilidad de la solución problema

En la tabla 5.51 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la repetibilidad de la solución problema, junto con la media, la desviación estándar y coeficiente de variación del factor respuesta para la equilina sulfato sódico y estrona sulfato sódico.

RESULTADOS REPETIBILIDAD DE LA SOLUCIÓN PROBLEMA							
Estrona sulfato sódico				Equilina sulfato sódico			
	Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	
1	15.7832	0.9103	0.0577	7.3045	0.4355	0.0596	
2	15.9623	0.9357	0.0586	7.3353	0.4503	0.0614	
3	16.0345	0.9562	0.0596	7.4453	0.4678	0.0628	
4	15.8932	0.9342	0.0588	7.2345	0.4412	0.0610	
5	16.1102	0.9654	0.0599	7.3845	0.4677	0.0633	
6	15.7237	0.8954	0.0569	7.3964	0.4701	0.0636	
Media:			0.0586	Media:			0.0620
S _(n-1) :			0.0011	S _(n-1) :			0.0016
CV(%):			1.94%	CV(%):			2.50%

Tabla 5.51: Resultados de la repetibilidad de la solución problema.

Para la repetibilidad de la solución estándar para la estrona sulfato sódico se obtiene una media de 0.0586 mientras que para la desviación estándar y coeficiente de variación se obtiene 0.0011 y 1.94%, respectivamente. En el caso de la equilina sulfato sódico, se obtiene un valor promedio de 0.0620, una desviación estándar de 0.0016 y un coeficiente de variación de 2.50%.

Los coeficientes de variación para las dos sustancias se encuentran por debajo del límite especificado al inicio de la validación (2.7%) indicando que la preparación de la solución problema posee una buena repetibilidad.

5.4.3.4 Precisión intermedia

En las tablas de 5.52 a la 5.55 se muestran los resultados para la evaluación de la precisión intermedia interdía y la precisión intermedia interanalista para las dos sustancias analizadas. También se presentan los valores de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores respuesta.

RESULTADOS PRECISIÓN INTERMEDIA PARA ESTRONA (mismo analista, días diferentes)						
Día 1				Día 2		
	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta
Nivel 50%	7.9248	0.4572	0.0577	7.9345	0.4672	0.0589
	7.9248	0.4354	0.0549	7.9280	0.4577	0.0577
	7.9248	0.4568	0.0576	7.8891	0.4678	0.0593
Nivel 100%	15.8496	0.9069	0.0572	15.7895	0.9101	0.0576
	15.8496	0.9132	0.0576	15.7765	0.8919	0.0565
	15.8496	0.8962	0.0565	15.8565	0.9251	0.0583
Nivel 150%	23.7742	1.3780	0.0580	23.8865	1.369	0.0573
	23.7742	1.3880	0.0584	23.8342	1.364	0.0572
	23.7742	1.3610	0.0572	23.9523	1.368	0.0571
					Media Interdía:	0.0575
					S _(n-1) :	0.0010
					CV(%) interdía:	1.70%

Tabla 5.52: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interdía para la estrona sulfato sódico.

RESULTADOS PRECISIÓN INTERMEDIA PARA ESTRONA (diferentes analistas, mismo día)						
ANALISTA A			ANALISTA B		ANALISTA C	
	Respuesta	Factor respuesta	Respuesta	Factor respuesta	Respuesta	Factor respuesta
Nivel 50%	0.4572	0.0577	0.4630	0.0586	0.4603	0.0577
	0.4354	0.0549	0.4531	0.0576	0.4614	0.0578
	0.4568	0.0576	0.4608	0.0597	0.4610	0.0585
Nivel 100%	0.9069	0.0572	0.9220	0.0582	0.9114	0.0573
	0.9132	0.0576	0.9074	0.0553	0.9166	0.0594
	0.8962	0.0565	0.9157	0.0587	0.9144	0.0579
Nivel 150%	1.3780	0.0580	1.3822	0.0595	1.3832	0.0565
	1.3880	0.0584	1.3701	0.0567	1.3736	0.0562
	1.3610	0.0572	1.3746	0.0576	1.3652	0.0561
					Media Interanalista:	0.0576
					S _(n-1) :	0.0012
					CV(%) interanalista:	2.04%

Tabla 5.53: Resultados de la precisión intermedia interanalista de la estrona sulfato sódico.

RESULTADOS PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EQUILINA (mismo analista, días diferentes)						
Día 1				Día 2		
	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta	Concentración (µg/ml)	Respuesta	Factor respuesta
Nivel 50%	3.6529	0.2231	0.0611	3.6573	0.2234	0.0611
	3.6529	0.2232	0.0611	3.6543	0.2205	0.0603
	3.6529	0.2219	0.0607	3.6364	0.2214	0.0609
Nivel 100%	7.3057	0.4403	0.0603	7.2779	0.4498	0.0618
	7.3057	0.444	0.0608	7.2720	0.4508	0.0620
	7.3057	0.4351	0.0596	7.3088	0.4467	0.0611
Nivel 150%	10.9586	0.6686	0.0610	11.0101	0.6684	0.0607
	10.9586	0.6500	0.0593	10.9860	0.6637	0.0604
	10.9586	0.6654	0.0615	11.0405	0.6594	0.0597
					Media Interdía:	0.0607
					S _(n-1) :	0.0007
					CV(%) interdía:	1.19%

Tabla 5.54: Resultados obtenidos para la precisión intermedia interdía correspondiente a la equilina sulfato sódico.

RESULTADOS PRECISIÓN INTERMEDIA PARA EQUILINA (diferentes analistas, mismo día)						
Analista A			Analista B		Analista C	
	Respuesta	Factor respuesta	Respuesta	Factor respuesta	Respuesta	Factor respuesta
Nivel 50%	0.2231	0.0611	0.2228	0.0610	0.2258	0.0620
	0.2232	0.0611	0.2242	0.0612	0.2204	0.0597
	0.2219	0.0607	0.2228	0.0612	0.2227	0.0613
Nivel 100%	0.4403	0.0603	0.4437	0.0607	0.4412	0.0606
	0.444	0.0608	0.4435	0.0605	0.4438	0.0601
	0.4351	0.0596	0.4476	0.0615	0.4431	0.0609
Nivel 150%	0.6686	0.0610	0.6665	0.0608	0.6714	0.0614
	0.6500	0.0593	0.6718	0.0611	0.6638	0.0599
	0.6654	0.0615	0.6705	0.0614	0.6659	0.0611
					Media Interanalista:	0.0608
					S _(n-1) interanalista:	0.0006
					CV(%) interanalista:	1.06%

Tabla 5.55: Resultados obtenidos en la precisión intermedia interanalista para la equilina sulfato sódico.

El estudio de la precisión para un mismo analista en diferentes días (precisión intermedia interdia) para la estrona sulfato sódico se obtiene una media global del factor respuesta de 0.0575, mientras que la desviación estándar es de 0.0010 y el coeficiente de variación es de 1.70%

En cuanto a los resultados de la estrona sulfato sódico para tres diferentes analistas se obtiene un valor medio global para el factor respuesta de 0.0576, mientras que los resultados obtenidos para la desviación estándar y coeficiente de variación son 0.0012 y 2.04%, respectivamente.

El estudio de la precisión para un mismo analista en diferentes días (precisión intermedia interdía) para la equilina sulfato sódico se obtiene una media global del factor respuesta de 0.0607, mientras que la desviación estándar es de 0.0007 y el coeficiente de variación es de 1.19%

En cuanto a los resultados de la equilina sulfato sódico para tres diferentes analistas se obtiene un valor medio global para el factor respuesta de 0.0608, mientras que los resultados obtenidos para la desviación estándar y coeficiente de variación son 0.0006 y 1.06%, respectivamente.

Por tanto los resultados obtenidos para los coeficientes globales de variación del factor respuesta para ambas sustancias cumple con la especificación fijada al inicio de la validación de 2.7% demostrándose así que la técnica analítica propuesta posee una buena precisión intermedia.

5.4.4 Resultados y discusión de la exactitud

En las tablas 5.56 y 5.57 se muestran los resultados de la exactitud para ambas sustancias, se indican la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el parámetro estadístico: t de Student experimental. Si t_{exp} es inferior a la t teórica, la media obtenida no es estadísticamente diferente al valor teórico (100%).

RESULTADOS EXACTITUD PARA ESTRONA				
	Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Concentración hallada (µg/ml)	Recuperación (%)
Nivel 50%	7.9248	0.4572	8.0384	101.43
	7.9248	0.4354	7.6667	96.74
	7.9248	0.4568	8.0315	101.35
	7.9345	0.4672	8.2089	103.46
	7.9280	0.4577	8.0469	101.50
	7.8891	0.4678	8.2191	104.18
Nivel 100%	15.8496	0.9069	15.7059	99.09
	15.8496	0.9132	15.8133	99.77
	15.8496	0.8962	15.5234	97.94
	15.7895	0.9101	15.7604	99.82
	15.7765	0.8919	15.4501	97.93
	15.8565	0.9251	16.0162	101.01
Nivel 150%	23.7742	1.3780	23.7383	99.85
	23.7742	1.3880	23.9088	100.57
	23.7742	1.3610	23.4484	98.63
	23.8865	1.3690	23.5848	98.74
	23.8342	1.3640	23.4996	98.60
	23.9523	1.3680	23.5678	98.39
Media: 99.94% $S_{(n-1)}$: 1.9548 CV:1.96% Valores mínimo-máximo: 96.74%-104.18% t_{EXP} :0.13 $t_{tablas}(\alpha=0.05, gdl=17)$: 2.16				

Tabla 5.56: Resultados obtenidos en la exactitud correspondiente a la estrona sulfato sódico.

RESULTADOS EXACTITUD PARA EQUILINA				
	Concentración teórica (µg/ml)	Respuesta	Concentración hallada (µg/ml)	Recuperación (%)
NIVEL 50%	3.6529	0.2231	3.6585	100.15
	3.6529	0.2232	3.6601	100.20
	3.6529	0.2219	3.6387	99.61
	3.6573	0.2234	3.6635	100.17
	3.6543	0.2205	3.6155	98.94
	3.6364	0.2214	3.6304	99.84
NIVEL 100%	7.3057	0.4403	7.2461	99.18
	7.3057	0.4440	7.3073	100.02
	7.3057	0.4351	7.1603	98.01
	7.2779	0.4498	7.4031	101.72
	7.2720	0.4508	7.4196	102.03
	7.3088	0.4467	7.3519	100.59
NIVEL 150%	10.9586	0.6686	11.0171	100.53
	10.9586	0.6500	10.7099	97.73
	10.9586	0.6654	10.9643	100.05
	11.0101	0.6684	11.0138	100.03
	10.9860	0.6637	10.9362	99.55
	11.0405	0.6594	10.8652	98.41
Media: 99.824% $S_{(n-1)}$: 1.1124 CV: 1.11% Valores mínimo-máximo: 97.73-102.03% t_{EXP} : 0.23 $t_{tablas}(\alpha=0.05, gdl=17)$: 2.16				

Tabla 5.57: Resultados obtenidos en la exactitud correspondiente a la equilina sulfato sódico.

El estudio de la recuperación de estrona sulfato sódico de la matriz considerada (excipientes de la formulación) se obtiene un valor medio de 99.82% siendo su desviación estándar de 1.9548 y su coeficiente de variación de 1.96%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 96.74% y 104.18%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico t de Student, hallando un valor experimental de 0.13, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 17 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

El estudio de la recuperación de equilina sulfato sódico de la matriz considerada (excipientes de la formulación) se obtiene un valor medio de 99.94% siendo su desviación estándar de 1.1124 y su coeficiente de variación de 1.11%. Los valores obtenidos para la recuperación en todos los niveles se encuentra entre 97.73% y 102.03%, encontrándose, por tanto, todos los valores de recuperación dentro del intervalo establecido al inicio de la validación de 95%-105%. Se realiza el estudio del parámetro estadístico *t* de Student, hallando un valor experimental de 0.23, siendo este valor inferior al establecido en las tablas para un nivel de probabilidad del 95% y 17 grados de libertad (2.16), por lo tanto la recuperación media no es estadísticamente diferente de la recuperación correcta del 100%.

Se puede concluir que la recuperación de la estrona sulfato sódico y equilina sulfato en la matriz para la metodología analítica desarrollada para el producto acabado es correcta, por lo tanto el método presenta una buena exactitud.

5.4.5 Resultados de la Validación del método analítico para el ensayo de disolución

5.4.5.1 Identificación del principio activo

En la figura 5.32 se observan un cromatograma de la solución de estándar donde aparecen un pico a 12.559 minutos que corresponde a la estrona sulfato sódico mientras que en el cromatograma (figura 5.33) de una muestra de disolución a las ocho horas se observan un pico a 12.455 minutos identificado como estrona sulfato sódico. Se observa un perfil semejante entre los dos cromatogramas, por lo que se puede concluir que la identificación del pico de la muestra respecto a la solución de referencia es positiva.

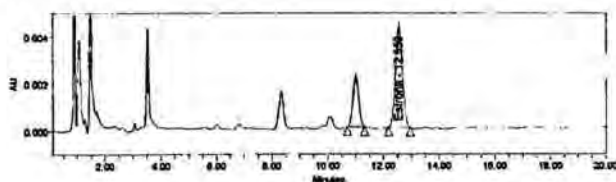


Figura 5.34: Cromatograma de la solución estándar

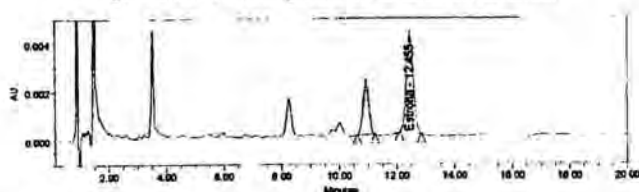


Figura 5.35: Cromatograma de la muestra después de 8 horas de disolución

Por otro lado al pico de estrona sulfato sódico se le realiza un estudio de pureza de pico indicando que los espectros tomados a diferentes tiempos se encuentran por debajo del umbral establecido por el sistema en consideración al ruido del aparato y el ángulo del solvente (figura 5.34). Se concluye por lo tanto que el pico de la estrona sulfato sódico es único sin interferencia de ningún pico que pudiera eluir en el mismo tiempo, por lo tanto se trata de un método selectivo.

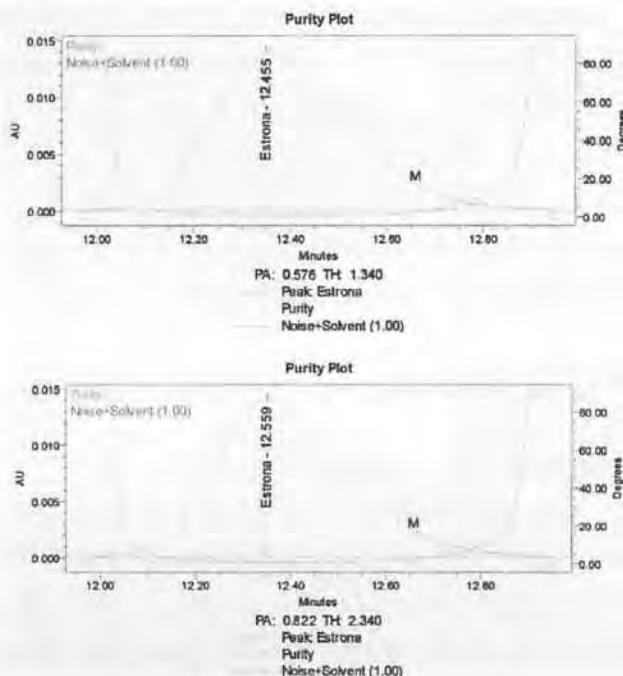


Figura 5.36: Estudio de pureza de los picos.

5.4.5.2 Ausencia de interferencias de los excipientes

En la figura 5.35 se adjunta el cromatograma correspondiente a la solución de estándar realizada con comprimidos placebo donde se observan la presencia de picos desconocidos en el frente del cromatograma. Los picos observados no supone una interferencia en el método ya que se encuentra en el frente alejado del pico debido a la estrona sulfato sódico, por lo tanto se puede concluir que el método es selectivo con respecto a los excipientes de la formulación.

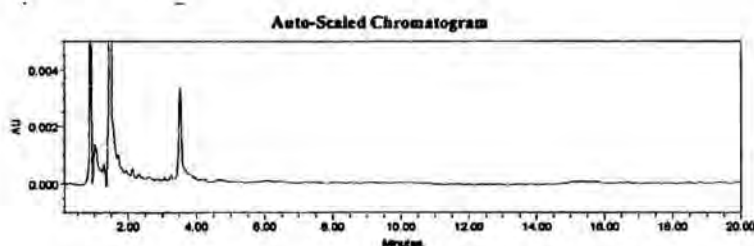


Figura 5.37: Cromatograma del placebo.

5.4.5.3 Muestra sometida a stress

La figura 5.36 corresponde al cromatograma obtenido con la solución de estándar realizada con comprimidos sometidos a 100 °C. Se puede observar que el método continúa separando correctamente el pico de la estrona sulfato sódico. Por lo tanto se puede concluir que ninguno de los picos que se pueden generar en condiciones extremas interfiere en la valoración del contenido de estrona sulfato sódico en el ensayo de disolución.

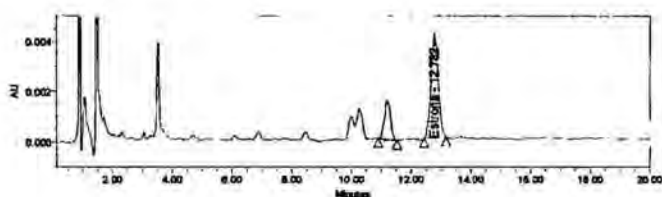


Figura 5.38: Cromatograma de la muestra estresada.

En conclusión se puede afirmar que el método utilizado en la valoración de la estrona sulfato sódico en el ensayo de disolución de las formulaciones es un método selectivo y apto para utilizar de forma rutinaria.

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES

6.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la evolución experimentada por la ciencia farmacéutica ha conducido a considerar al medicamento como un sistema físico-químico de vida limitada y razones de orden ético, legal y económico obliga a los laboratorios farmacéuticos a estudiar la estabilidad de todo medicamento, con el fin de conseguir la formulación lo más estable posible y determinar el plazo de validez de la misma.

Según las normas de correcta fabricación, el término de estabilidad aplicado a los medicamentos define la cualidad de mantener las características originales durante el periodo de conservación. La estabilidad del medicamento depende de los factores ambientales tales como la temperatura ambiental, la humedad ambiental y la exposición a la luz y de las propiedades innatas del producto tales como las propiedades físicas y químicas del principio activo y los excipientes, la forma farmacéutica, el proceso de elaboración y del material de acondicionamiento.

La finalidad de un estudio de estabilidad es proporcionar la evidencia de cómo la calidad de un medicamento varía con el tiempo y llegar a establecer el periodo de

validez del medicamento y las recomendaciones de almacenamiento. El estudio de la estabilidad del medicamento debe hacerse siempre con el material de acondicionamiento definitivo, pues la variación de sus características puede modificar la estabilidad del medicamento.

El estudio de la estabilidad consiste en someter a unas condiciones determinadas de temperatura y humedad al medicamento y periódicamente controlar ciertos parámetros susceptibles de alterarse en el tiempo pudiendo afectar a la calidad y seguridad del medicamento. Las guías ICH (108,109) define 3 tipos diferentes de ensayo cuyas condiciones varían según a que zona climática mundial pertenece el país de comercialización del medicamento. En la siguiente tabla se muestra los tres tipos de ensayo, las condiciones de almacenamiento de las muestras y tiempo mínimo de duración del ensayo para la zona climática II (zona templada) que corresponde a la mayor parte de Europa.

TIPO DE ESTUDIO	CONDICIONES ALMACENAMIENTO	TIEMPO MÍNIMO
Largo plazo	25 °C±2 °C/60%±5%HR	12 meses
Plazo intermedio	30 °C±2 °C/65%±5%HR	6 meses
Acelerado (corto plazo)	40 °C±2 °C/75%±5%HR	6 meses

Tabla 6.1: Tipos de estudio, condiciones de almacenamiento y tiempo mínimo de duración del ensayo para un estudio de estabilidad en zona climática II.

Para armonizar los estudios a largo plazo entre las diferentes zonas climáticas las ICH indican que en las zonas climáticas I y II se puede realizar a 2 condiciones posibles: 25 °C±2 °C y 60%±5%HR ó 30 °C ±2 °C y 65%±5%HR. En el caso que se elija la condición de 30 °C, la estabilidad a plazo intermedio no existirá.

Para los estudios a largo plazo, la frecuencia de análisis debe ser suficiente para poder establecer el perfil de estabilidad del producto. Si el plazo de validez del producto se prevé que sea al menos 12 meses, la frecuencia de ensayo en este caso es normalmente cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses en el segundo año y anualmente hasta el plazo de validez propuesto.

En el estudio a corto plazo se recomienda tener como mínimo 3 puntos de análisis incluyendo el punto inicial y final, por ejemplo a 0, 3 meses y 6 meses, sin embargo un aumento de los puntos puede proporcionar una mayor información sobre la estabilidad

del producto. Si a los 6 meses de iniciado el estudio a largo plazo o en el estudio a corto plazo se observan cambios significativos, el estudio de plazo intermedio se debe ampliar hasta 12 meses como mínimo. Según las guías ICH, un cambio significativo se define como:

- Una disminución del 5% en el ensayo de riqueza respecto al valor inicial.
- Algún producto de degradación excede a la especificación inicial.
- No cumplir con alguna especificación fijada al inicio del ensayo, pueden ser atributos físicos o galénicos (apariencia, olor, pH, dureza, etc.), sin embargo en el caso del estudio de estabilidad a corto plazo pueden haber cambios en los atributos físicos.
- No cumplir la especificación inicial del ensayo de disolución.

6.2 OBJETIVO

El objetivo del estudio de estabilidad es conocer la estabilidad de las tres formulaciones consideradas óptimas en el Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración y el efecto del material acondicionado en la estabilidad de las mismas. A partir de los datos de estabilidad obtenidos se elegirá que formulación es más estable y cuál es el material de acondicionado más adecuado.

6.3 METODOLOGÍA

6.3.1 Diseño del estudio

Se plantea un estudio de estabilidad a corto plazo a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $75\% \pm 5\%\text{HR}$ durante 6 meses y un estudio a largo plazo a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%\text{HR}$ durante 12 meses. El estudio se realiza con las muestras obtenidas en el Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración que corresponden a las formulaciones llamadas 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en diferentes materiales de acondicionamiento PVC-Alu, Perlalux y Al-Al.

Los comprimidos acondicionados se introducen en 2 cámaras climáticas en las condiciones de temperatura y humedad anteriormente citadas. En la tabla 6.2 se muestra las condiciones de temperatura y humedad de cada una de las dos cámaras climáticas.

CÁMARA CLIMÁTICA	CONDICIONES CLIMÁTICAS
Cámara A	25 °C±2 °C/60%±5%HR
Cámara B	40 °C±2 °C/75%±5%HR

Tabla 6.2: Resumen de las condiciones de las 2 cámaras utilizadas en el estudio de estabilidad

En cada cámara climática se incorporan el número de unidades de cada formulación para cubrir todos los ensayos previstos para cada uno de los tiempos.

En la tabla 6.3 se muestran programación teórica del ensayo de estabilidad indicando las diferentes tiempos de evaluación de las muestras.

PROGRAMACIÓN DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD		
TIEMPO	Cámara A	Cámara B
Inicial	✓	
1 mes	✓	✓
3 meses	✓	✓
6 meses	✓	✓
9 meses	✓	
12 meses	✓	

Tabla 6.3: Resumen de la programación del estudio de estabilidad.

6.3.2 Material

Para la realización del estudio de estabilidad se utilizan las formulaciones óptimas obtenidas en el Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración. Las formulaciones son acondicionadas con 3 materiales de acondicionamiento primario diferentes: Blíster de PVC (cloruro de polivinilo) soldado a una lámina de aluminio semirrígido recubierto internamente con una laca adherente; Perlalux Tristar 250.25.90 compuesto por una lámina de PVdC (cloruro de polivinilideno), PE(polietileno) y PVC termosellado con lámina de aluminio+PVdC y láminas de aluminio-aluminio termosellado.

El resto de material necesario para realizar el estudio de la estabilidad está descrito en cada uno de los ensayos a realizar en el Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración.

6.3.3 Métodos

La evaluación de la estabilidad se realiza determinando los parámetros considerados susceptibles de alterarse en el tiempo, cuyos ensayos se realizarán en los tiempos anteriormente comentados. Los ensayos que se realizarán son los siguientes:

1. Características organolépticas de los comprimidos
2. Ensayo de uniformidad de masa de los comprimidos
3. Ensayo de riqueza de los comprimidos
4. Velocidad de disolución de los comprimidos
5. Perfil estrogénico
6. Ensayo de humedad en los comprimidos

Los métodos de cada uno de los ensayos se han descrito en el Capítulo 4: Estudio de la formulación y técnica de elaboración.

En la tabla 6.4 se muestra el número de comprimidos que son necesarios para realizar cada evaluación del estado de conservación de las muestras.

ENSAYO	Nº DE COMPRIMIDOS NECESARIOS
Aspecto	20
Uniformidad de masa	20
Contenido de estrona	10
Contenido en Equilina	10
Humedad	10
Perfil estrogénico	10
Disolución	6

Tabla 6.4: Resumen del número de comprimidos a analizar por ensayo.

6.4 ESPECIFICACIONES

Para cada uno de los ensayos a realizar se fijan una especificación que se habrá de cumplir a lo largo de todo el ensayo de estabilidad. Los resultados de los ensayos serán marcadores de la calidad o no calidad del producto durante el estudio de estabilidad. En la tabla 6.5 se muestran las especificaciones para cada uno de los ensayos y los métodos utilizados.

Ensayo	Método de análisis	Especificaciones
Aspecto	Método organoléptico	Comprimidos biconvexos recubiertos de color rojo
Humedad	F. Eur. 5ª Ed.	Inferior a 5%
Uniformidad de masa	F. Eur. 5ª Ed.	Media $\pm 7.5\%$ (mín. 18 comprimidos) Media $\pm 15\%$ (máx. 2 comprimidos)
Contenido en estrona sulfato sódico	Método HPLC propio	95-105% (75/318/EEE)
Contenido en equilina sulfato sódico	Método HPLC propio	95-105% (75/318/EEE)
Perfil estrogenico EQ/ES	Método HPLC propio	0.35-0.65
Perfil estrogenico DHEQ/ES	Método HPLC propio	0.25-0.35
Ensayo de disolución (% estrona sulfato sódico disuelta)	USP 29	2 horas: 19 a 49% 5 horas: 66 a 96% 8 horas: Mayor que 80%

Tabla 6.5: Resumen de los métodos y especificaciones establecidas para el estudio de estabilidad

6.5 EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS

6.5.1 Características organolépticas

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en el aspecto de los comprimidos durante el estudio de estabilidad que son reflejo de cambios en las propiedades físicas, químicas o galénicas del producto.

6.5.2 Humedad

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en el contenido de agua de los comprimidos durante el estudio de estabilidad que puede influir en la estabilidad de las formulaciones.

En las tablas de resultados se presenta el contenido en agua en forma de porcentaje para cada tiempo. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar si existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de agua durante el estudio de estabilidad para las muestras del mismo tipo y mismas condiciones de almacenamiento.

6.5.2.1 Uniformidad de masa

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en la masa de los comprimidos durante el estudio de estabilidad a causa de los efectos de las condiciones de almacenamiento.

Se presentan en las tablas la masa media, masa mínima y máxima. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la masa durante el estudio de estabilidad para las muestras del mismo tipo y mismas condiciones.

6.5.2.2 Contenido de estrona sulfato sódico

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en el contenido de principio activo, estrona sulfato sódico, de los comprimidos durante el estudio de estabilidad y evaluar la idoneidad de la formulación.

Se presentan en las tablas el contenido medio de estrona sulfato sódico. En los gráficos se muestra el límite para considerar un cambio significativo y los límites superior e inferior para cumplir las especificaciones. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de estrona sulfato sódico durante el estudio de estabilidad para las muestras del mismo tipo y mismas condiciones.

6.5.2.3 Contenido de equilina sulfato sódico

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en el contenido de principio activo, equilina sulfato sódico, de los comprimidos durante el estudio de estabilidad y evaluar la idoneidad de la formulación.

Se presentan en las tablas el contenido medio de equilina sulfato sódico. En los gráficos se muestra el límite para considerar un cambio significativo y los límites superior e inferior para cumplir las especificaciones. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de equilina sulfato sódico durante el estudio de estabilidad para las muestras del mismo tipo y mismas condiciones.

6.5.2.4 Perfil estrogénico

En el ensayo se calcula los cocientes entre el área del pico que corresponde a la equilina sulfato sódico respecto al área del pico que corresponde a la estrona sulfato sódico y entre el área que corresponde a la 17 α -dihidroequilina sulfato sódico respecto al área del pico que corresponde a la estrona sulfato sódico. Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en la cantidad de Equilina sulfato sódico y 17 α -dihidroequilina sulfato sódico que son susceptibles de sufrir variaciones durante el estudio de estabilidad.

Se presentan en las tablas el valor medio para cada uno de los cocientes. En los gráficos se muestra el límite para considerar un cambio significativo y los límites superior e inferior para cumplir las especificaciones. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos cocientes durante el estudio de estabilidad para las muestras del mismo tipo y mismas condiciones.

6.5.2.5 Ensayo de disolución

Los resultados del ensayo permiten observar las posibles variaciones en el ensayo de disolución de los comprimidos durante el estudio de estabilidad.

Se presentan en las tablas el porcentaje medio de disolución para los tres niveles del ensayo de disolución: 2 horas, 5 horas y 8 horas. En los gráficos se muestra el valor medio y los límites de las especificaciones. El ensayo de disolución no se efectúan en las muestras que se encuentren fuera de la especificación en cuanto al contenido de estrona sulfato sódico. Los ensayos de disolución no realizados se marcan con una zona gris en las tablas. Para la evaluación estadística se utiliza el paquete estadístico Statgraphics versión 5.1. Se aplicará un test de Cochran y un análisis de la variancia de un factor (ANOVA) con la finalidad de averiguar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el ensayo de disolución para cada tiempo y las muestras del mismo tipo y mismas condiciones.

6.5.3 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de las formulaciones, tiempos y temperaturas estudiadas en forma de tablas y en forma de gráfico conjunto.

FORMULACIÓN: 50/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	37.29 (39.47-35.40)	72.29 (69.12-75.29)	88.97 (85.60-92.29)
1 mes	Conforme	3.5	205.2 (201.0-210.5)	102.80	91.23	0.42	0.28	37.79 (34.66-40.63)	72.97 (69.15-75.90)	90.68 (88.05-92.47)
3 meses	Conforme	3.6	207.9 (202.5-212.0)	100.31	93.14	0.41	0.27	36.12 (32.46-38.91)	75.99 (73.66-78.97)	94.38 (90.92-96.52)
6 meses	Conforme	3.6	206.7 (202.5-211.4)	100.80	84.94	0.38	0.13	35.04 (31.02-38.71)	72.96 (68.96-76.21)	90.30 (87.53-93.96)

Tabla 6.6: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	37.29 (35.40-39.47)	72.39 (69.12-75.29)	88.97 (85.60-92.29)
1 mes	Conforme	3.6	204 (200.4-208.6)	98.82	92.06	0.42	0.12	35.14 (27.91-38.53)	75.50 (69.91-78.02)	90.35 (89.28-92.10)
3 meses	Conforme	3.7	208.4 (203.6-212.4)	99.12	79.13	0.36	0.05	32.68 (27.33-36.97)	70.93 (68.95-73.77)	85.05 (82.86-86.86)
6 meses	Conforme	3.9	207.4 (202.7-211.1)	92.48	49.22	0.24	0.03			

Tabla 6.7: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 50/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	37.29 (35.40-39.47)	72.39 (69.12-75.29)	88.97 (86.72-92.29)
1 mes	Conforme	4.2	207.0 (202.5-215.0)	86.09	47.72	0.25	0.04			
3 meses	Conforme	4.8	205.6 (201.0-210.5)	83.20	35.03	0.19	0.00			
6 meses	Conforme	5.3	206.4 (201.6-213.6)	79.88	24.76	0.14	0.02			

Tabla 6.8: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en PVC-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	37.29 (35.40-39.47)	72.39 (69.11-75.29)	88.97 (85.60-92.29)
1 mes	Conforme	3.4	205.4 (200.6-210.4)	103.57	98.76	0.43	0.30	37.30 (34.11-40.09)	73.71 (72.29-75.74)	87.79 (84.98-91.05)
3 meses	Conforme	3.6	206.6 (201.8-212.0)	102.12	99.64	0.44	0.31	37.83 (34.60-40.66)	73.20 (69.74-75.41)	88.40 (86.82-90.70)
6 meses	Conforme	3.7	207.5 (202.0-211.4)	103.40	96.32	0.42	0.28	34.65 (31.69-37.91)	73.96 (72.09-76.41)	88.16 (86.29-90.80)
9 meses	Conforme	3.4	205.3 (200.6-211.3)	102.75	97.98	0.43	0.31	34.20 (31.41-36.45)	74.33 (71.76-77.11)	88.95 (85.88-91.74)
12 meses	Conforme	3.7	206.5 (200.9-212.2)	103.09	98.28	0.44	0.27	35.14 (31.47-37.17)	73.07 (70.67-74.80)	88.17 (85.98-90.70)

Tabla 6.9: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.42	0.29	37.29 (35.40-39.47)	72.39 (69.12-75.29)	88.97 (85.60-92.29)
1 mes	Conforme	3.6	206.3 (200.6-212.5)	102.38	98.46	0.42	0.30	37.31 (36.47-40.58)	72.85 (68.71-74.24)	86.27 (84.03-88.12)
3 meses	Conforme	3.5	208.4 (205.5-214.6)	101.16	98.11	0.42	0.30	37.36 (34.65-40.64)	72.55 (68.53-74.37)	89.99 (87.14-91.29)
6 meses	Conforme	3.7	207.3 (203.4-212.6)	101.07	99.50	0.44	0.29	36.01 (32.66-39.02)	71.54 (69.14-73.54)	89.06 (86.72-92.05)
9 meses	Conforme	3.6	205.3 (199.2-210.5)	100.31	96.44	0.42	0.21	35.91 (32.57-37.77)	71.49 (68.00-73.09)	88.79 (85.51-90.81)
12 meses	Conforme	3.8	204.7 (198.3-209.7)	100.80	96.44	0.42	0.12	34.86 (32.62-36.44)	69.57 (66.80-72.40)	87.62 (85.34-89.50)

Tabla 6.10: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 50/1

MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.4	206.0 (201.4-209.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	37.29 (35.40-39.47)	72.39 (69.12-75.29)	88.97 (86.72-92.29)
1 mes	Conforme	3.7	204.5 (200.3-210.4)	100.32	93.26	0.41	0.06	36.05 (32.55-38.83)	74.79 (71.19-79.28)	89.27 (85.32-92.58)
3 meses	Conforme	3.7	207.3 (202.3-212.0)	100.19	86.05	0.38	0.05	35.42 (33.55-37.26)	74.23 (69.38-78.46)	89.84 (87.82-91.82)
6 meses	Conforme	3.7	206.8 (202.6-212.5)	100.98	78.50	0.35	0.04	35.54 (34.18-37.83)	72.87 (67.95-76.59)	88.16 (85.94-91.41)
9 meses	Conforme	3.8	205.7 (200.6-211.3)	98.45	74.21	0.33	0.03	35.17 (33.01-39.08)	73.20 (68.74-76.53)	87.84 (85.89-90.16)
12 meses	Conforme	3.7	206.9 (200.9-212.7)	96.23	72.99	0.32	0.00	35.04 (32.47-40.21)	70.24 (68.12-72.10)	87.51 (83.59-90.45)

Tabla 6.11: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/1 acondicionada en Pvc-aluminio.

Capítulo 6: Estudio de estabilidad de las formulaciones

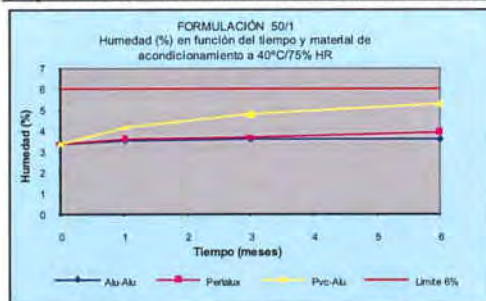


Gráfico 1. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de humedad en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

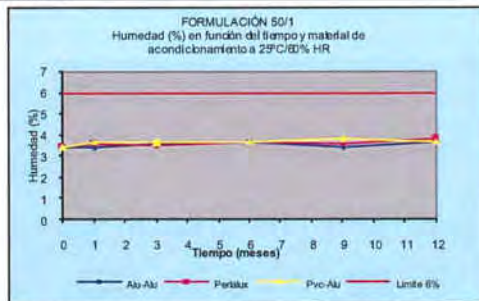


Gráfico 2. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de humedad en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

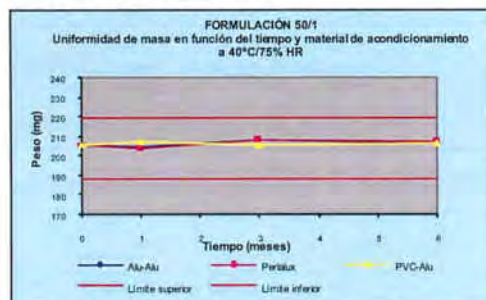


Gráfico 3. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de uniformidad de masa en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

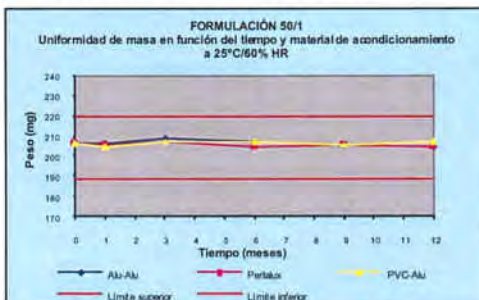


Gráfico 4. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de uniformidad de masa en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

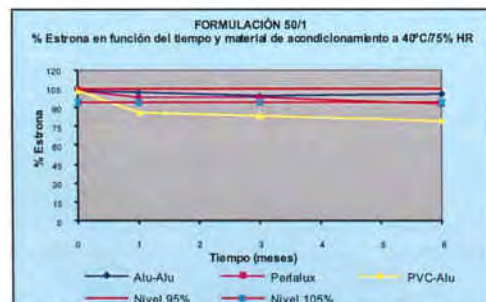


Gráfico 5. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de contenido en estrona en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

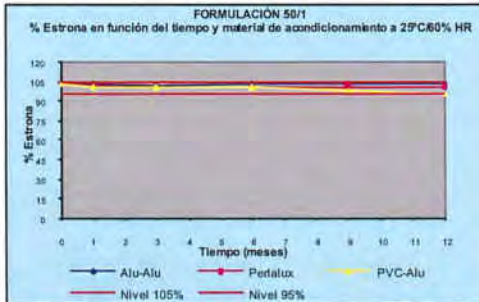


Gráfico 6. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de contenido en estrona en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

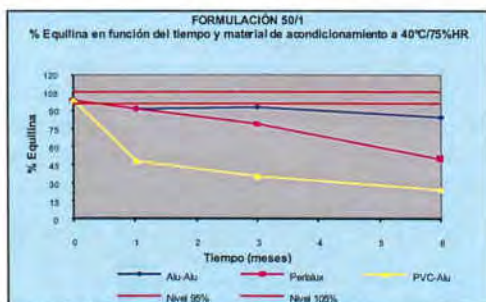


Gráfico 7. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de contenido en equilina en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

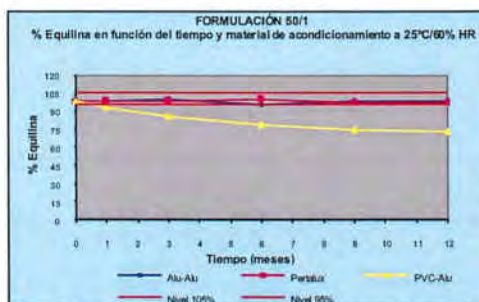


Gráfico 8. Representación gráfica correspondiente a la variación del ensayo de contenido en equilina en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

Capítulo 6: Estudio de estabilidad de las formulaciones

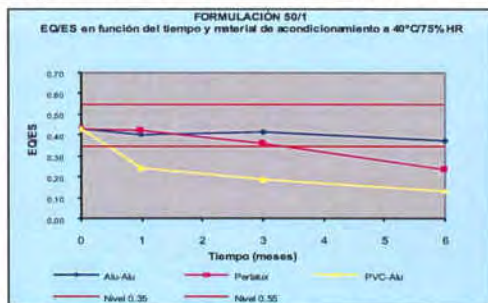


Gráfico 9. Representación gráfica correspondiente a la variación de E_q/E_s en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

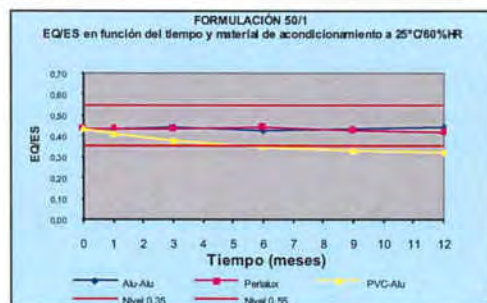


Gráfico 10. Representación gráfica correspondiente a la variación de E_q/E_s en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

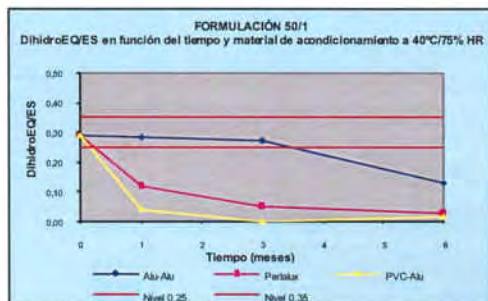


Gráfico 11. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/ES en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

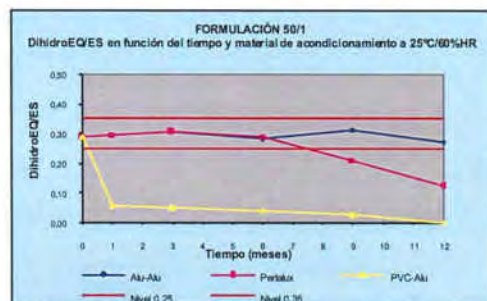


Gráfico 12. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/ES en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

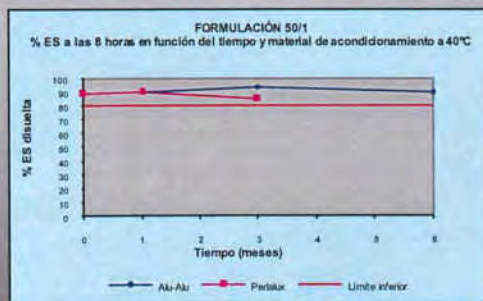
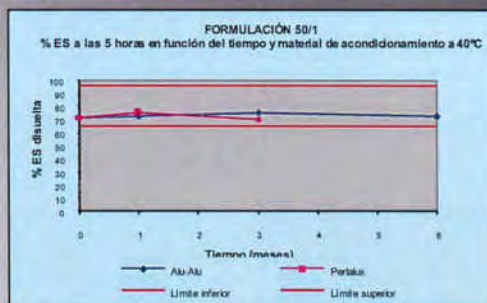
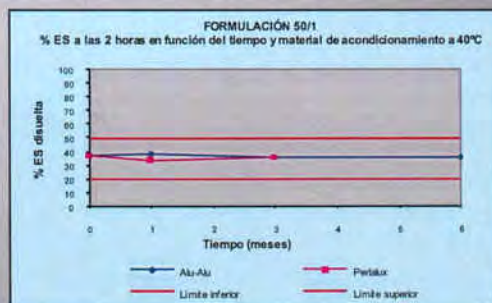


Gráfico 13. Representaciones gráficas correspondientes a la % ES disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

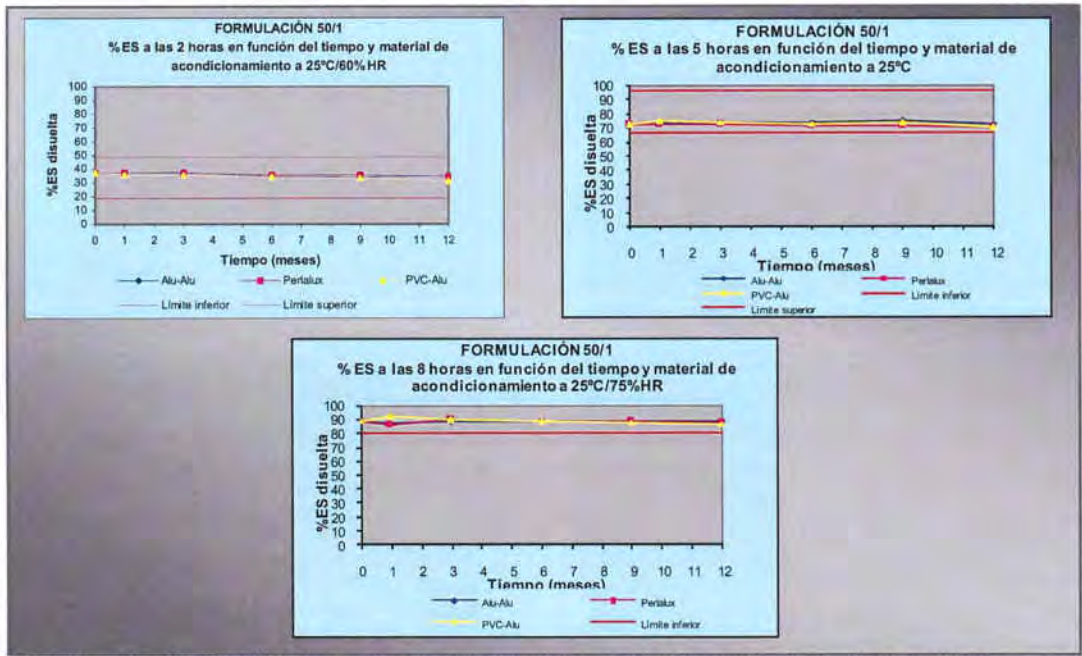


Gráfico 14. Representaciones gráficas correspondientes a la % ES disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.48)
1 mes	Conforme	3.4	207.3 (203.1-213.9)	102.59	95.55	0.42	0.27	33.94 (31.13-36.53)	70.70 (66.17-75.50)	91.28 (86.97-95.82)
3 meses	Conforme	3.5	210.5 (204.3-216.4)	102.20	95.02	0.42	0.20	34.06 (31.81-37.06)	72.89 (70.66-76.96)	89.99 (87.96-94.91)
6 meses	Conforme	3.6	209.6 (205.3-215.0)	102.45	82.93	0.38	0.10	31.56 (27.90-33.19)	70.83 (66.43-72.97)	87.62 (83.19-90.67)

Tabla 6.12: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	DhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.48)
1 mes	Conforme	3.4	210.5 (204.3-216.4)	101.08	89.6	0.40	0.09	33.85 (30.99-36.01)	71.05 (67.50-76.18)	90.96 (87.88-94.28)
3 meses	Conforme	3.7	212.3 (206.7-218.4)	96.27	76.85	0.36	0.05	29.87 (26.44-33.07)	70.95 (68.43-75.35)	90.93 (88.42-94.40)
6 meses	Conforme	3.7	208.5 (203.5-213.5)	91.39	54.72	0.27	0.04			

Tabla 6.13: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.48)
1 mes	Conforme	3.7	210.5 (204.5-215.0)	93.07	53.66	0.36	0.04			
3 meses	Conforme	3.7	208.3 (204.2-214.3)	87.12	38.65	0.30	0.00			
6 meses	Conforme	4.0	211.5 (206.5-215.2)	80.42	23.18	0.21	0.00			

Tabla 6.14: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en pvc-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.48)
1 mes	Conforme	3.4	208.5 (203.5-212.5)	102.28	95.37	0.42	0.29	35.05 (31.32-36.56)	71.98 (66.81-75.39)	90.69 (86.02-94.08)
3 meses	Conforme	3.6	210.5 (204.2-215.2)	102.29	96.40	0.42	0.30	33.65 (31.84-34.63)	71.23 (66.89-73.07)	91.45 (87.03-93.24)
6 meses	Conforme	3.6	211.5 (203.5-212.5)	102.54	95.39	0.42	0.28	33.03 (28.86-35.62)	71.27 (66.66-74.83)	89.57 (85.18-92.28)
9 meses	Conforme	3.6	208.5 (202.7-213.1)	101.96	95.02	0.42	0.28	32.54 (28.11-35.64)	70.56 (66.57-74.01)	91.22 (88.76-94.86)
12 meses	Conforme	3.5	210.1 (204.4-214.5)	102.61	95.68	0.42	0.25	35.09 (31.20-38.06)	71.73 (68.42-74.93)	89.55 (85.66-92.22)

Tabla 6.15: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.58)
1 mes	Conforme	3.5	210.9 (203.6-216.9)	103.24	95.38	0.42	0.28	31.65 (28.50-34.38)	68.13 (65.21-72.16)	88.20 (83.68-91.37)
3 meses	Conforme	3.6	213.2 (202.5-214.4)	102.89	94.25	0.42	0.27	31.76 (29.26-35.10)	70.50 (66.64-73.20)	87.68 (83.58-90.59)
6 meses	Conforme	3.5	209.7 (203.5-213.2)	101.98	96.38	0.43	0.26	30.92 (27.45-33.98)	69.00 (65.91-71.70)	89.69 (86.12-92.49)
9 meses	Conforme	3.6	208.5 (202.1-214.4)	103.52	93.43	0.42	0.19	31.44 (29.10-33.81)	67.77 (64.94-71.06)	87.48 (83.40-90.27)
12 meses	Conforme	3.7	212.5 (204.3-213.5)	103.58	84.94	0.38	0.05	29.08 (24.39-32.77)	67.47 (64.69-71.00)	87.53 (82.70-91.06)

Tabla 6.16: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 50/2
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.5	209.1 (203.4-214.8)	104.00	98.81	0.43	0.29	32.17 (29.13-34.26)	68.21 (64.45-72.90)	87.01 (82.02-89.48)
1 mes	Conforme	3.4	208.3 (205.2-213.4)	102.57	94.43	0.39	0.05	30.58 (27.63-35.92)	68.20 (65.32-72.46)	87.11 (84.48-88.93)
3 meses	Conforme	3.6	207.7 (202.2-211.5)	102.12	90.23	0.37	0.04	31.57 (26.88-34.50)	68.14 (66.20-69.63)	86.63 (82.83-90.92)
6 meses	Conforme	3.7	210.4 (203.4-215.1)	101.14	87.23	0.36	0.03	32.25 (28.21-36.42)	67.17 (64.60-69.43)	87.91 (85.37-92.37)
9 meses	Conforme	3.6	208.5 (204.1-211.2)	101.40	83.43	0.30	0.01	29.36 (26.25-33.39)	66.46 (63.32-69.16)	86.13 (84.06-86.14)
12 meses	Conforme	3.6	210.0 (205.6-214.6)	101.46	84.94	0.25	0.01	27.43 (24.21-31.74)	64.68 (61.12-67.80)	84.88 (82.90-88.34)

Tabla 6.17: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 50/2 acondicionada en Pvc-aluminio.

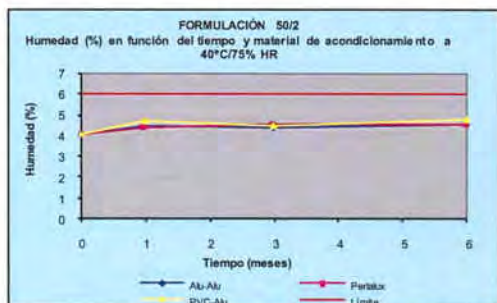


Gráfico 15. Representación gráfica correspondiente a la variación de la humedad (%) en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

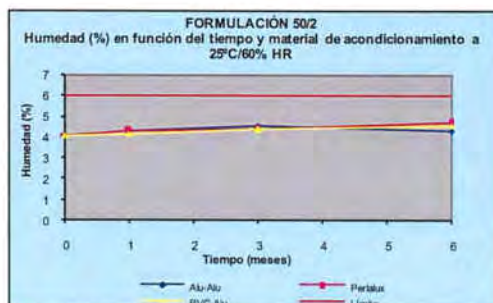


Gráfico 16. Representación gráfica correspondiente a la variación de la humedad (%) en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

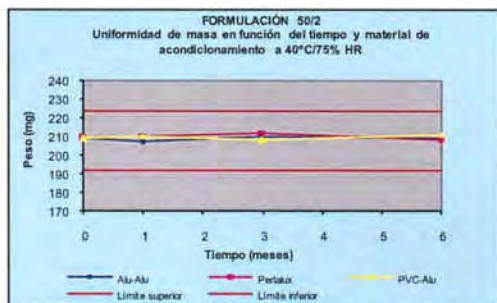


Gráfico 17. Representación gráfica correspondiente al ensayo de uniformidad de masa en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

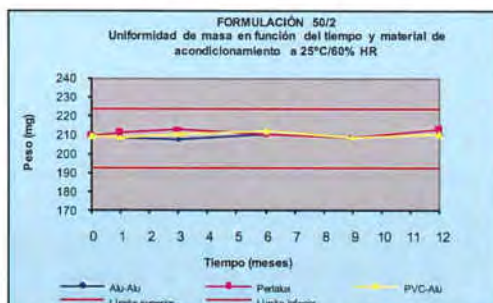


Gráfico 18. Representación gráfica correspondiente al ensayo de uniformidad de masas en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

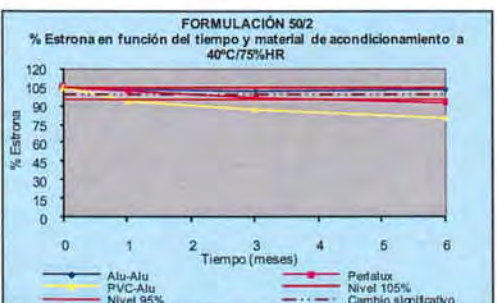


Gráfico 19. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Estrona en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

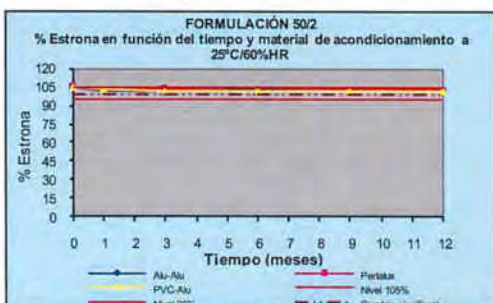


Gráfico 20. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Estrona en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

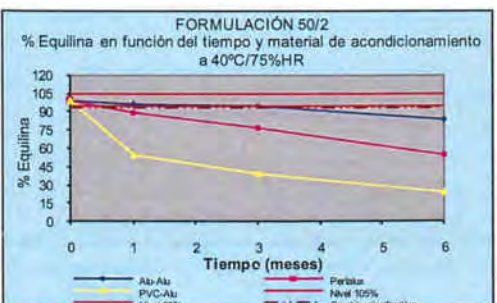


Gráfico 21. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Equilina en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

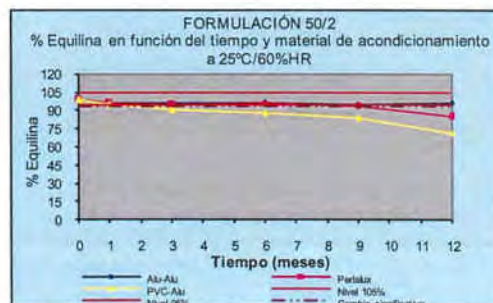


Gráfico 22. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Equilina en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

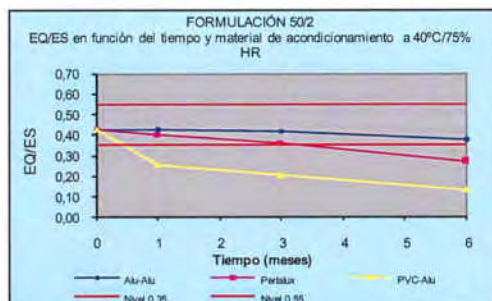


Gráfico 23. Representación gráfica correspondiente a la variación de Eq/Es en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

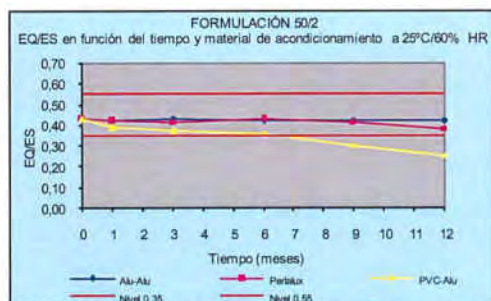


Gráfico 24. Representación gráfica correspondiente a la variación de Eq/Es en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

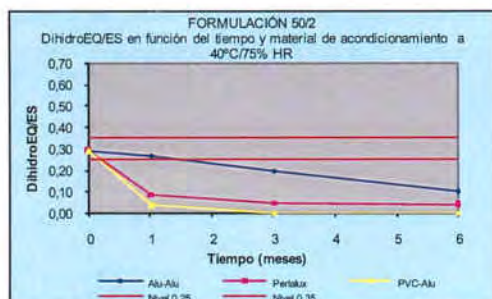


Gráfico 25. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/Es en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

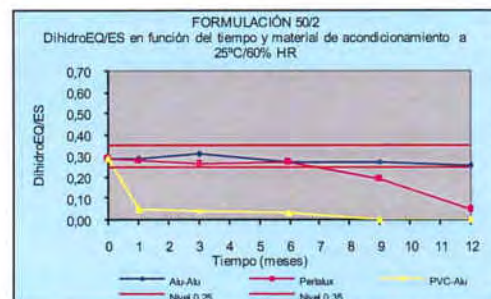


Gráfico 26. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/Es en función del tiempo para la formulación 50/2 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

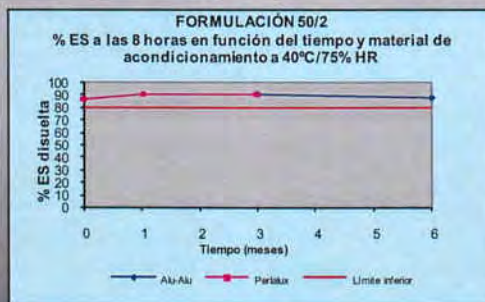
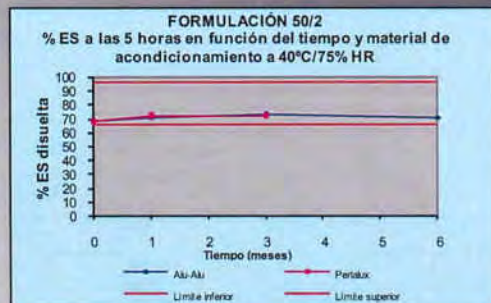
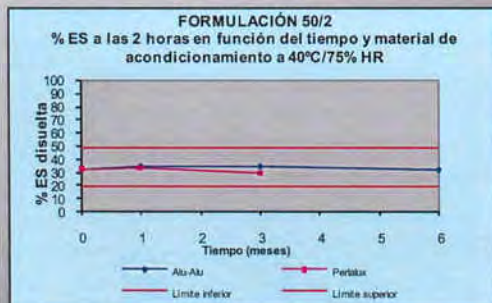


Gráfico 27. Representación gráfica correspondientes a la % ES disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

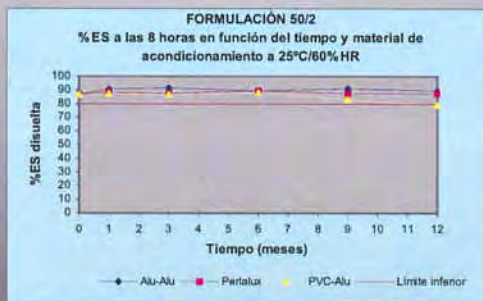
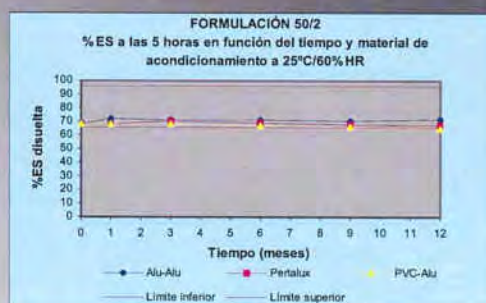
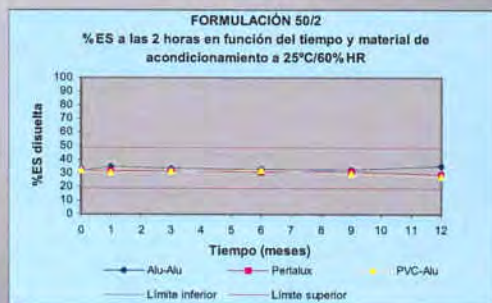


Gráfico 28. Representación gráfica correspondientes a la % ES disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 50/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

FORMULACIÓN: 52/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	DhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.5	203.5 (198.4-206.4)	103.00	100.94	0.44	0.28	37.81 (36.43-40.24)	69.16 (66.44-72.25)	86.07 (83.72-88.84)
3 meses	Conforme	3.5	206.3 (200.5-210.4)	104.33	100.10	0.44	0.27	37.40 (34.50-38.92)	67.03 (64.22-69.61)	85.15 (83.59-87.27)
6 meses	Conforme	3.6	205.3 (201.5-211.3)	103.43	100.14	0.43	0.27	36.96 (33.82-39.10)	68.02 (65.80-70.35)	84.83 (83.25-86.80)

Tabla 6.18: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 52/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.5	206.0 (201.4-211.9)	103.39	102.12	0.45	0.26	35.96 (34.35-37.82)	68.16 (66.67-70.14)	86.53 (85.85-87.32)
3 meses	Conforme	3.4	203.4 (198.4-207.8)	102.59	97.17	0.42	0.23	37.78 (35.54-38.73)	67.81 (65.33-70.34)	86.42 (82.31-88.61)
6 meses	Conforme	3.5	205.6 (199.1-209.4)	102.87	83.57	0.36	0.21	37.26 (34.62-39.61)	67.86 (66.70-69.19)	87.67 (83.11-89.16)

Tabla 6.19: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 52/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 40 °C y 75% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.7	206.4 (203.4-211.6)	96.38	66.25	0.31	0.18	39.46 (36.87-41.87)	73.19 (70.23-75.35)	92.26 (88.81-95.43)
3 meses	Conforme	3.8	205.4 (200.1-210.5)	95.08	61.11	0.29	0.17	39.40 (37.26-41.23)	72.64 (71.32-75.47)	92.44 (89.45-96.99)
6 meses	Conforme	4.2	203.8 (198.4-208.5)	93.68	49.86	0.24	0.14			

Tabla 6.20: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (40 °C y 75% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en Pvc-aluminio.

FORMULACIÓN: 52/1
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: ALUMINIO-ALUMINIO
CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	DhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.6	205.6 (201.3-210.5)	104.32	102.11	0.45	0.27	36.37 (34.44-38.34)	66.18 (64.80-68.52)	83.34 (82.08-84.21)
3 meses	Conforme	3.5	207.4 (203.2-212.3)	104.93	102.05	0.45	0.26	36.44 (34.31-39.12)	67.13 (64.67-69.08)	84.29 (82.55-86.63)
6 meses	Conforme	3.7	204.0 (198.5-207.5)	102.99	100.73	0.45	0.29	37.69 (36.04-38.94)	67.98 (65.29-69.74)	84.92 (82.71-87.95)
9 meses	Conforme	3.7	205.6 (200.5-213.5)	103.44	100.94	0.44	0.28	39.09 (35.99-38.09)	68.21 (67.57-69.53)	84.91 (81.79-87.09)
12 meses	Conforme	3.6	206.3 (201.6-215.3)	104.36	101.84	0.45	0.27	38.27 (35.60-37.98)	67.53 (64.31-70.00)	84.25 (81.62-86.50)

Tabla 6.21: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en aluminio-aluminio.

FORMULACIÓN: 52/1

MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PERLALUX

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.6	205.6 (201.5-211.1)	102.88	102.01	0.45	0.28	37.41 (34.27-39.81)	68.37 (66.43-70.05)	84.23 (83.06-86.97)
3 meses	Conforme	3.6	206.5 (201.3-212.4)	104.07	101.83	0.45	0.27	36.29 (33.98-40.30)	67.60 (65.52-69.11)	84.79 (80.76-87.38)
6 meses	Conforme	3.6	204.1 (199.0-209.3)	103.00	100.83	0.44	0.28	37.89 (34.42-40.73)	66.79 (65.07-68.49)	86.17 (82.65-89.05)
9 meses	Conforme	3.5	205.5 (200.5-211.4)	103.17	100.65	0.44	0.28	37.79 (36.71-39.44)	67.84 (66.48-68.93)	85.04 (82.08-87.82)
12 meses	Conforme	3.7	206.2 (201.5-213.6)	102.99	101.90	0.44	0.27	37.85 (35.13-39.38)	68.03 (65.87-70.10)	87.99 (86.25-90.10)

Tabla 6.22: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en Perlalux.

FORMULACIÓN: 52/1

MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: PVC-ALUMINIO

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 25 °C y 60% humedad relativa

Tiempo	Aspecto	Humedad	Peso (mg)	Riqueza (%)		Perfil estrogénico		Disolución (Es %)		
				Es	Eq	Eq/Es	dhEq/Es	2 horas	5 horas	8 horas
Inicial	Conforme	3.7	204.7 (200.2-209.8)	103.82	101.30	0.44	0.28	37.23 (34.87-40.98)	67.54 (63.77-70.74)	84.64 (82.47-87.20)
1 mes	Conforme	3.6	206.4 (201.4-210.3)	104.02	101.48	0.44	0.26	36.24 (33.42-38.86)	67.08 (64.54-68.49)	85.86 (82.14-89.11)
3 meses	Conforme	3.6	203.4 (198.6-208.4)	103.65	102.42	0.45	0.25	36.34 (33.96-39.29)	67.46 (64.72-69.37)	86.25 (83.50-87.60)
6 meses	Conforme	3.7	205.7 (200.4-210.4)	102.57	101.69	0.45	0.26	37.55 (35.96-38.50)	67.47 (65.36-71.08)	85.37 (83.16-88.26)
9 meses	Conforme	3.5	206.2 (201.5-212.5)	102.13	99.16	0.43	0.23	36.25 (33.52-39.32)	68.45 (66.15-70.45)	86.68 (83.41-89.64)
12 meses	Conforme	3.6	207.3 (202.5-213.5)	101.63	97.39	0.42	0.25	37.53 (34.54-40.15)	68.85 (66.10-71.60)	87.90 (84.64-90.40)

Tabla 6.23: Resultados que corresponden al estudio de estabilidad a corto plazo (25 °C y 60% HR) para la formulación 52/1 acondicionada en Pvc-aluminio.

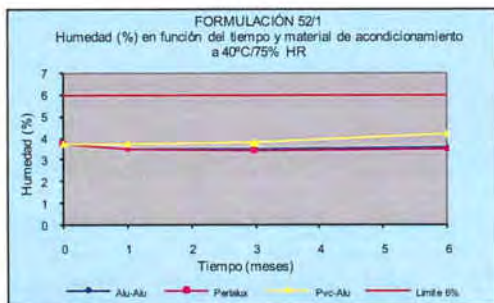


Gráfico 29. Representación gráfica correspondiente a la humedad (%) en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

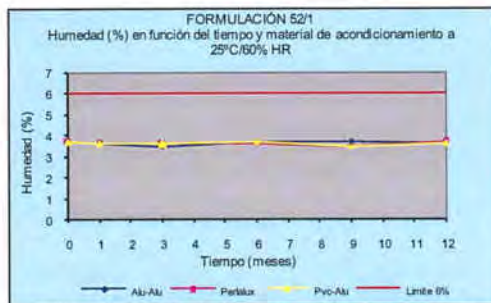


Gráfico 30. Representación gráfica correspondiente a la humedad (%) en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

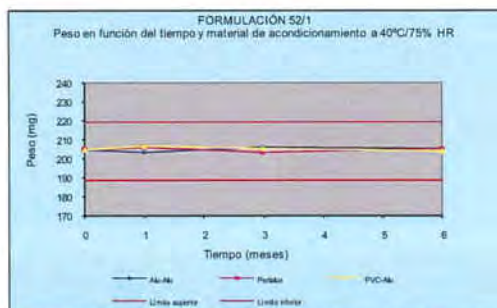


Gráfico 31. Representación gráfica correspondiente al ensayo de uniformidad de masa en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

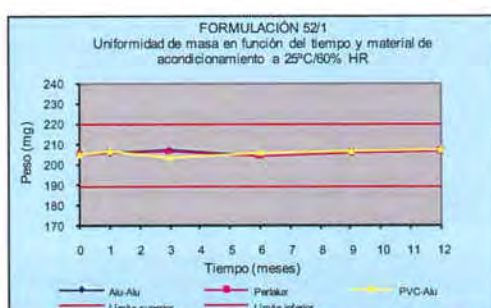


Gráfico 32. Representación gráfica correspondiente al ensayo de uniformidad en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

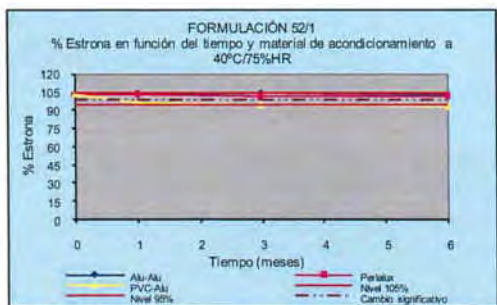


Gráfico 33. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Estrona en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

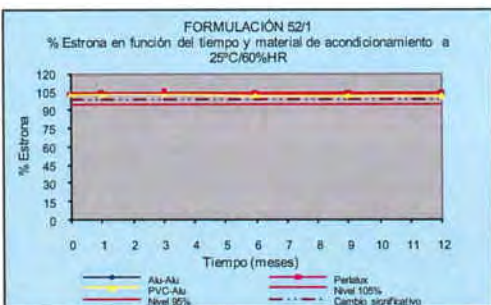


Gráfico 34. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Estrona en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

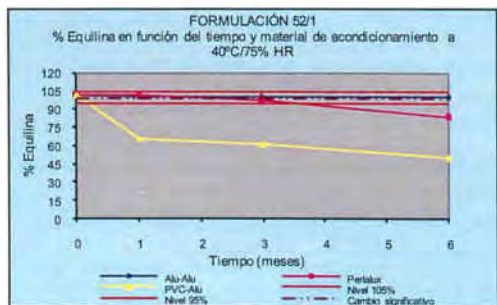


Gráfico 35. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Equilina en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

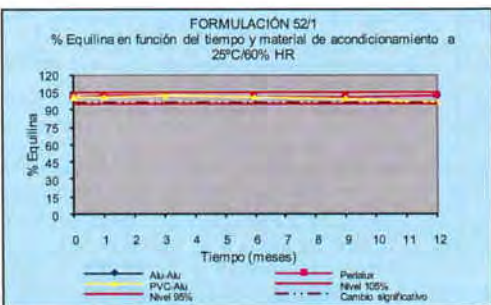


Gráfico 36. Representación gráfica correspondiente a la variación de %Equilina en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/40%HR.

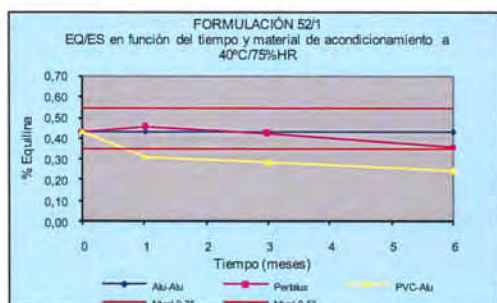


Gráfico 37. Representación gráfica correspondiente a la variación de Eq/Es en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

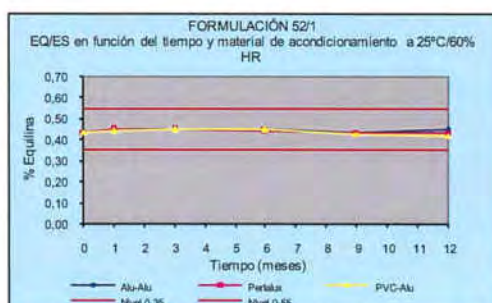


Gráfico 38. Representación gráfica correspondiente a la variación de Eq/Es en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

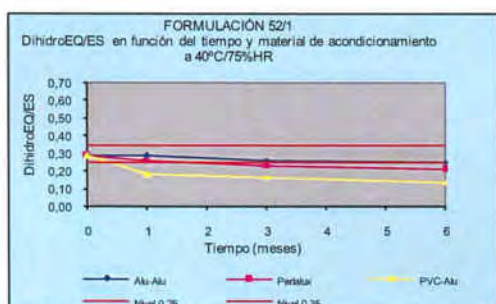


Gráfico 39. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/Es en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

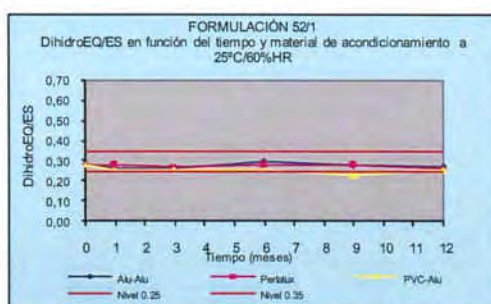


Gráfico 40. Representación gráfica correspondiente a la variación de DihidroEQ/Es en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 25 °C/60%HR.

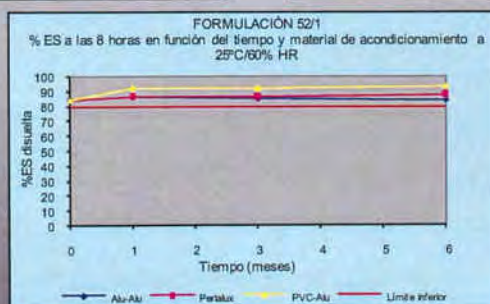
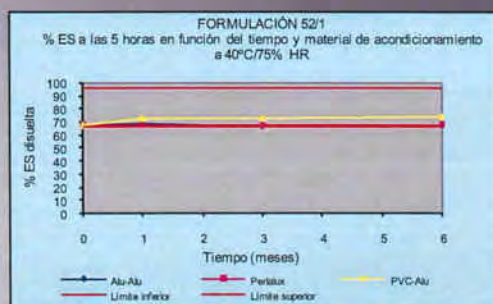
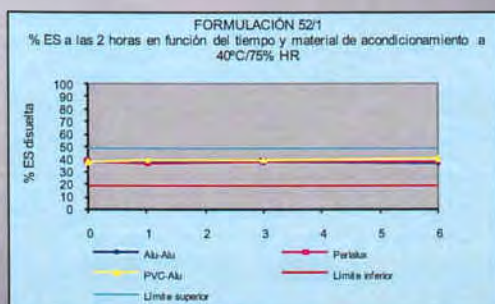


Gráfico 41: Representaciones gráficas correspondientes al % de Estrona disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

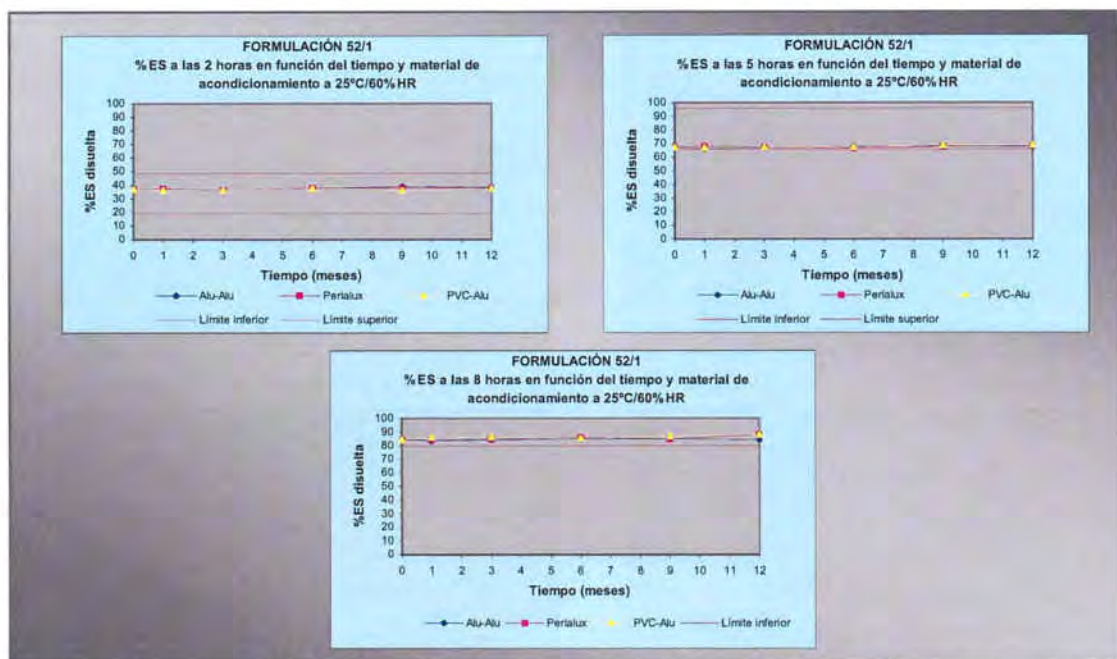


Gráfico 39: Representaciones gráficas correspondientes al % de Estrona disuelta en los tres niveles (2, 5, 8 horas) en función del tiempo para la formulación 52/1 en las condiciones de 40 °C/75%HR.

6.5.3.1 Resultados estadístico del ensayo de humedad

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3444 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.11751 p-valor: 0.8648			Contraste de Hartley: 3.44444 Test de Levene: 0.137931 p-valor: 0.934542		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0466667	3	0.155556	0.21	0.8885
Intra grupos	0.6	8	0.075		
**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.24: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.397436 p-valor: 0.875125 Contraste de Bartlett: 1.0707 p-valor: 0.929243			Contraste de Hartley: 2.38462 Test de Levene: 0.0763889 p-valor: 0.971001		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.309167	3	0.103056	1.59	0.2674
Intra grupos	0.52	8	0.065		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.25: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 Perilux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*						
Contraste C de Cochran: 0.508197 p-valor: 0.475811			Contraste de Hartley: 7.75			
Contraste de Bartlett: 1.34571 p-valor: 0.579526			Test de Levene: 0.380952 p-valor: 0.769592			
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor	
Entre grupos	6.0225	3	2.0075	39.49	0.0000	
Intra grupos	0.406667	8	0.0508333			
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***						
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos			
Inicial	3.43333	3	X			
1 mes	4.23333	3			X	
3 meses	4.83333	3				X
6 meses	5.33333	3				X

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.26: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.336957 p-valor: 0.768885			Contraste de Hartley: 7.75		
Contraste de Bartlett: 1.22792 p-valor: 0.840395			Test de Levene: 0.1875 p-valor: 0.961762		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.289444	5	0.0578889	1.13	0.3949
Intra grupos	0.613333	12	0.0511111		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.27: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.292453 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 31.0		
Contraste de Bartlett: 1.44235 p-valor: 0.596373			Test de Levene: 0.296774 p-valor: 0.90549		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.213333	5	0.0426667	0.72	0.6180
Intra grupos	0.706667	12	0.0588889		
** p-valor superior a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.28: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 Perlalux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.369048 p-valor:0.599976			Contraste de Hartley: 4.42857		
Contraste de Bartlett: 1.12796 p-valor:0.943943			Test de Levene: 0.15 p-valor: 0.97613		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.202778	5	0.0405556	0.87	0.5294
Intra grupos	0.56	12	0.0455557		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.29: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.411765 p-valor: 0.814167			Contraste de Hartley: 2.33333		
Contraste de Bartlett: 1.06669 p-valor: 0.934516			Test de Levene: 0.111111 p-valor: 0.951173		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0833333	3	0.0277778	1.96	0.1985
Intra grupos	0.113333	8	0.0141667		
** p-valor superior a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.30: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.28		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 1.75	
Contraste de Bartlett: 1.02693		p-valor: 0.981375		Test de Levene: 0.0769231	
p-valor: 0.970715					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1825	3	0.0608333	2.92	0.1003
Intra grupos	0.166667	8	0.0208333		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.31: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/2 Perlux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.382353		p-valor: 0.9425		Contraste de Hartley: 1.85714	
Contraste de Bartlett: 1.04018		p-valor: 0.967218		Test de Levene: 0.0625 p-valor: 0.978179	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.3025	3	0.100833	3.56	0.0671
Intra grupos	0.226667	8	0.0283333		
**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.32: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.409091			p-valor: 0.43227		
Contraste de Bartlett: 1.31486			p-valor: 0.738462		
Contraste de Hartley: 9.0			p-valor: 0.957674		
Test de Levene: 0.19697			p-valor: 0.957674		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0777778	5	0.0155556	0.32	0.8926
Intra grupos	0.586667	12	0.0488889		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.33: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.391304 p-valor: 0.501363			Contraste de Hartley: 27.0		
Contraste de Bartlett: 1.43459 p-valor: 0.604482			Test de Levene: 0.490909 p-valor: 0.777102		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.116111	5	0.0232222	0.61	0.6973
Intra grupos	0.46	12	0.0383333		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.34: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo humedad para la formulación 50/2 Perlalux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran:0.324675			p-valor: 0.84278		
Contraste de Bartlett: 1.22259			p-valor: 0.846505		
Contraste de Hartley: 6.25			Test de Levene: 0.16		
			p-valor: 0.972596		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.111667	5	0.0223333	0.52	0.7553
Intra grupos	0.513333	12	0.0427778		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.35: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.382353 p-valor: 0.9425			Contraste de Hartley: 1.85714		
Contraste de Bartlett: 1.04018 p-valor: 0.967218			Test de Levene: 0.0625 p-valor: 0.978179		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.23	3	0.0766667	2.71	0.1157
Intra grupos	0.226667	8	0.0283333		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.36: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.383929 p-valor: 0.935306	Contraste de Hartley: 3.30769
Contraste de Bartlett: 1.11832 p-valor: 0.863667	Test de Levene: 0.155172 p-valor: 0.923428

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.3	3	0.1	1.07	0.4141
Intra grupos	0.746667	8	0.0933333		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.37: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 Perilux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.396226 p-valor: 0.880406	Contraste de Hartley: 3.0
Contraste de Bartlett: 1.07673 p-valor: 0.921205	Test de Levene: 0.0987654 p-valor: 0.958483

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.369167	3	0.123056	2.79	0.1096
Intra grupos	0.353333	8	0.0441667		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.38: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.246154 p-valor: 1.0	Contraste de Hartley: 16.0
Contraste de Bartlett: 1.31239 p-valor: 0.74135	Test de Levene: 0.187234 p-valor: 0.961874

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.196111	5	0.0392222	0.78	0.5854
Intra grupos	0.606667	12	0.0505556		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.39: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.394366 p-valor: 0.488879			Contraste de Hartley: 28.0		
Contraste de Bartlett: 1.4478 p-valor: 0.590734			Test de Levene: 0.415385 p-valor: 0.829246		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.231667	5	0.0463333	1.17	0.3766
Intra grupos	0.473333	12	0.0394444		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.40: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.394366 p-valor: 0.488879			Contraste de Hartley: 9.33333		
Contraste de Bartlett: 1.25713 p-valor: 0.80642			Test de Levene: 0.339394 p-valor: 0.87934		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.169444	5	0.0338889	0.86	0.5352
Intra grupos	0.473333	12	0.0394444		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.41: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de humedad para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.2 Resultados del estudio estadísticos para ensayo de uniformidad de peso

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2826 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 1.2715		
Contraste de Bartlett: 1.0037 p-valor: 0.9649			Test de Levene: 0.1169 p-valor: 0.9499		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	35.3704	3	11.7901	1.66	0.1835
Intra grupos	540.978	76	7.1181		
* p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.42: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2739 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 1.1994		
Contraste de Bartlett: 1.0021 p-valor: 0.9843			Test de Levene: 0.4827 p-valor: 0.6953		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	26.6024	3	8.8675	1.28	0.2868
Intra grupos	525.818	76	6.9187		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.43: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3191 p-valor: 0.6441*			Contraste de Hartley: 2.3193		
Contraste de Bartlett: 1.0533 p-valor: 0.2766*			Test de Levene: 1.4946 p-valor: 0.2228*		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	58.1284	3	10.3761	1.53	0.2131
Intra grupos	961.368	76	12.6496		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.44: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2643 p-valor: 0.2046*			Contraste de Hartley: 2.3540		
Contraste de Bartlett: 1.0384 p-valor: 0.5198*			Test de Levene: 0.3245 p-valor: 0.8973*		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	46.3808	5	9.2762	0.90	0.4853
Intra grupos	1178.02	114	10.3335		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.45: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2402			Contraste de Hartley: 2.8352		
Contraste de Bartlett: 1.0665			Test de Levene: 1.8266		
p-valor: 0.4627*			p-valor: 0,1131		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	15.0017	5	3.0003	0.22	0.9537
Intra grupos	1561.42	114	13.6966		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.46: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 Perlalux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2367 Contraste de Bartlett: 1.0335			Contraste de Hartley: 2.2432 Test de Levene: 1.9846		
p-valor:0.5163*			p-valor: 0.0862*		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	64.7548	5	12.951	1.18	0.3245
Intra grupos	1253.68	114	10.9972		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.47: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3155			Contraste de Hartley: 1.6891		
Contraste de Bartlett: 1.0187			Test de Levene: 0.4770		
p-valor: 0.6908			p-valor: 0.6993		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	19.5505	3	6.5168	0.80	0.4987
Intra grupos	620.485	76	8.1643		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.48: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3047 p-valor: 0.8436			Contraste de Hartley: 1.3453		
Contraste de Bartlett: 1.0075 p-valor: 0.9070			Test de Levene: 0.7161 p-valor: 0.5454		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	6.505	3	2.1683	0.13	0.9430
Intra grupos	1283.69	76	16.8906		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.49: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3496		p-valor: 0.3379		Contraste de Hartley: 1.9275	
Contraste de Bartlett: 1.0353		p-valor: 0.4608		Test de Levene: 2.1054 p-valor: 0.1065	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	28.7174	3	9.5725	0.65	0.5852
Intra grupos	1118.81	76	14.7212		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.50: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2243 p-valor: 0.7470			Contraste de Hartley: 1.4608		
Contraste de Bartlett: 1.0103 p-valor:0.9501			Test de Levene: 1.0417 p-valor: 0.3968		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	47.4667	5	9.4934	0.62	0.6843
Intra grupos	1743.6	114	15.2948		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.51: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2160 p-valor: 0.9413			Contraste de Hartley: 1.6		
Contraste de Bartlett: 1.0152 p-valor: 0.8912			Test de Levene: 0.8965 p-valor: 0.4861		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	21.6257	5	4.3251	0.27	0.9274
Intra grupos	1810.57	114	15.8822		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.52: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2297		p-valor: 0.6389	Contraste de Hartley: 1.6114		
Contraste de Bartlett: 1.0130		p-valor: 0.9191	Test de Levene: 0.9771 p-valor: 0.4349		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	51.4067	5	10.2813	0.69	0.6333
Intra grupos	1702.91	114	14.9378		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.53: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3155		p-valor: 0.6908	Contraste de Hartley: 1.6891		
Contraste de Bartlett: 1.0187		p-valor: 0.7106	Test de Levene: 0.4770 p-valor: 0.6993		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	19.5505	3	6.5168	0.80	0.4987
Intra grupos	620.485	76	8.1643		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.54: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3044		p-valor: 0.8481		Contraste de Hartley: 1.4706	
Contraste de Bartlett: 1.0101		p-valor: 0.8617		Test de Levene: 0.3869	
				p-valor: 0.7627	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	38.277	3	12.759	1.41	0.2463
Intra grupos	687.473	76	9.0457		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.55: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3313		p-valor: 0.5037		Contraste de Hartley: 2.6791	
Contraste de Bartlett: 1.0655		p-valor: 0.1935		Test de Levene: 1.7169 p-valor: 0.1706	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	35.2135	3	11.7378	1.60	0.1964
Intra grupos	557.614	76	7.3370		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.56: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2588		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 2.4743	
Contraste de Bartlett: 1.0643		p-valor: 0.2233		Test de Levene: 1.5792 p-valor: 0.1715	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	32.524	5	6.5048	0.68	0.6360
Intra grupos	1083.04	114	9.5003		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.57: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2082		p-valor: 1.0	Contraste de Hartley: 1.7919		
Contraste de Bartlett: 1.0205		p-valor: 0.8109	Test de Levene: 0.5479 p-valor: 0.7396		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	51.4527	5	10.2905	0.96	0.4469
Intra grupos	1224.84	114	9.5003		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.58: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 Peralux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.1927		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 1.5223	
Contraste de Bartlett: 1.0085		p-valor: 0.9666		Test de Levene: 0.3099	
				p-valor: 0.9061	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	38.468	5	7.6936	1.05	0.3942
Intra grupos	838.264	114	7.3541		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.59: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.3 Resultados estadístico para el contenido en Estrona

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3618

p-valor: 1.0000

Contraste de Hartley:2.9043

Test de Levene: 0.0558

p-valor: 0.9814

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	26.7952	3	8.9317	6.22	0.0174
Intra grupos	11.4799	8	1.4350		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos			
Inicial	104.00	3	X			
1 mes	102.80	3	X	X		
3 meses	100.31	3				X
6 meses	100.80	3		X	X	

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.60: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3412 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.0323 p-valor: 0.9759			Contraste de Hartley:1.9799 Test de Levene: 0.0466 p-valor:0.9857		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	200.9070	3	66.9691	41.11	0.0000
Intra grupos	11.4799	8	1.4350		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X X X X		
1 mes	98.82	3			
3 meses	99.12	3			
6 meses	92.48	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.61: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 Perilux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3448 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.0367 p-valor: 0.9711			Contraste de Hartley:1.8895 Test de Levene: 0.0225 p-valor: 0.9951		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	1044.95	3	348.317	274.15	0.0000
Intra grupos	10.1644	8	1.2706		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X X X X		
1 mes	86.09	3			
3 meses	83.20	3			
6 meses	79.88	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.62: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.1885 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.0034 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley:1.2665 Test de Levene: 0.0022 p-valor: 1.0000		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	6.5141	5	1.3028	0.84	0.5459
Intra grupos	18.5919	12	1.5493		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.63: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2289 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 2.1077		
Contraste de Bartlett: 1.0379 p-valor: 0.9960			Test de Levene: 0.0573 p-valor: 0.9973		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	27.4327	5	5.4865	3.21	0.0454
Intra grupos	20.5034	12	1.7086		
* p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X		
1 mes	102.38	3	X	X	
3 meses	101.16	3		X	
6 meses	101.07	3		X	
9 meses	100.31	3		X	
12 meses	100.80	3		X	
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.64: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 Perlux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2145		p-valor: 1.0000		Contraste de Hartley: 3.0181	
Contraste de Bartlett: 1.0701		p-valor: 0.9840		Test de Levene: 0.1102	
				p-valor: 0.9840	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	101.0750	5	20.215	14.85	0.0001
Intra grupos	16.3392	12	1.3616		
* p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X		
1 mes	100.32	3	X X		
3 meses	100.19	3	X X		
6 meses	100.98	3	X		
9 meses	98.45	3	X		
12 meses	96.23	3	X		
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.65: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4694 p-valor: 0.5974 Contraste de Bartlett: 1.1923 p-valor: 0.7616			Contraste de Hartley: 4.6348 Test de Levene: 0.2083 p-valor: 1.0000		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	5.9102	3	1.9701	2.11	0.1771
Intra grupos	7.4659	8	0.9332		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.66: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4502 Contraste de Bartlett: 1.1421			p-valor: 0.6648 p-valor: 0.8304		
			Contraste de Hartley: 3.8396 Test de Levene: 01462		
			p-valor: 0.9293		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	282.1690	3	94.0564	96.65	0.0000
Intra grupos	7.7849	8	0.9731		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X		
1 mes	101.08	3		X	
3 meses	96.27	3			X
6 meses	91.24	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.67: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 Peralux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3359 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.0712 p-valor: 0.9286			Contraste de Hartley: 2.4889 Test de Levene: 0.0979 p-valor: 0.9590		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	900.8010	3	300.2670	227.59	0.0000
Intra grupos	10.5547	8	1.3193		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X		
1 mes	93.07	3		X	
3 meses	87.12	3			X
6 meses	80.42	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.68: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3972 p-valor: 0.4777 Contraste de Bartlett: 1.2312 p-valor: 0.8366			Contraste de Hartley: 7.8497 Test de Levene: 0.1588 p-valor: 0.9731		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	7.7385	5	1.5477	1.13	0.3939
Intra grupos	16.3663	12	1.3639		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.69: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.1903 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.0059 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 1.3332 Test de Levene: 0.0084 p-valor: 1.0000		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	7.4106	5	1.4821	0.90	0.5103
Intra grupos	19.7017	12	1.6418		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.70: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 Perlaux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.1960 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 1.3602		
Contraste de Bartlett: 1.0059 p-valor: 1.0000			Test de Levene: 0.0081 p-valor: 1.0000		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	16.9797	5	3.3959	2.17	0.1266
Intra grupos	18.8127	12	1.5677		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	104.00	3	X		
1 mes	102.57	3	X	X	
3 meses	102.12	3	X	X	
6 meses	101.14	3		X	
9 meses	101.39	3		X	
12 meses	101.46	3		X	
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.71: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2932 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 1.8604		
Contraste de Bartlett: 1.0290 p-valor: 0.9793			Test de Levene: 0.0425 p-valor: 0.9875		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	2.8906	3	0.9635	0.77	0.5446
Intra grupos	10.0706	8	1.2588		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.72: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3580 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 2.7932		
Contraste de Bartlett: 1.0806 p-valor: 0.9160			Test de Levene: 0.1324 p-valor: 0.9381		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	6.7610	3	2.2537	2.24	0.1610
Intra grupos	8.0496	8	1.0062		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	103.82	3	X		
1 mes	103.39	3	X	X	
3 meses	102.59	3	X	X	
6 meses	101.87	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.73: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2840 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 1.5791		
Contraste de Bartlett: 1.0164 p-valor: 0.9909			Test de Levene: 0.0321 p-valor: 0.9917		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	184.268	3	61.4227	55.69	0.0000
Intra grupos	8.8241	8	1.1030		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	103.82	3	X X X X		
1 mes	96.38	3			
3 meses	95.08	3			
6 meses	93.68	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.74: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.1896 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 1.8356		
Contraste de Bartlett: 1.0192 p-valor: 0.9992			Test de Levene: 0.0368 p-valor: 0.9991		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	7.3871	5	1.4774	1.15	0.3856
Intra grupos	15.3650	12	1.2804		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.75: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4323 p-valor: 0.3539			Contraste de Hartley: 41.7837		
Contraste de Bartlett: 1.5390 p-valor: 0.5028			Test de Levene: 0.5059 p-valor: 0.7667		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	3.6965	5	0.7393	0.72	0.6180
Intra grupos	12.2439	12	1.0203		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.76: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 Peralux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.2110
p-valor: 1.0000

Contraste de Bartlett: 1.0253
p-valor: 0.9985

Contraste de Hartley: 2.0127
Test de Levene: 0.0521
p-valor: 0.9979

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	14.8635	5	2.9727	3.24	0.0443
Intra grupos	11.0187	12	0.9182		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	103.82	3	X	X	
1 mes	104.02	3	X		
3 meses	103.65	3	X	X	
6 meses	102.57	3	X	X	X
9 meses	102.13	3		X	X
12 meses	101.63	3			X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.77: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Estrona para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.4 Resultados estadísticos para el contenido en Equilina

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2909		p-valor: 1.0000		Contraste de Hartley: 1.2931	
Contraste de Bartlett: 1.0052		p-valor: 0.9983		Test de Levene: 0.0139	
				p-valor: 0.9976	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	294.0420	3	98.0141	137.63	0.0000
Intra grupos	5.6973	8	0.7122		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	91.23	3		X	
3 meses	93.14	3			X
6 meses	84.94	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.78: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3634 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 2.3633		
Contraste de Bartlett: 1.0487 p-valor: 0.9572			Test de Levene: 0.1257 p-valor: 0.9422		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	4340.57	3	1446.86	2537.75	0.0000
Intra grupos	4.5611	8	0.5701		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X X X X		
1 mes	92.06	3			
3 meses	79.13	3			
6 meses	49.22	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.79: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 Peralux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.5134 Contraste de Bartlett: 1.1861			p-valor: 0.4609 p-valor: 0.7698		
Contraste de Hartley: 4.6913 Test de Levene: 0.4353			p-valor: 0.7338		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	9714.8	3	3238.27	8025.45	0.0000
Intra grupos	3.228	8	0.4035		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	47.72	3		X	
3 meses	35.03	3			X
6 meses	24.76	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.80: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2744 p-valor: 1.0000 Contraste de Bartlett: 1.2010 p-valor: 0.8708			Contraste de Hartley: 9.4791 Test de Levene: 0.2918 p-valor: 0.9085		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	4.1366	5	0.8273	0.90	0.5098
Intra grupos	10.9879	12	0.9157		
** p-valor superior a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.81: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2774 p-valor: 1.0000			Contraste de Hartley: 3.6171		
Contraste de Bartlett: 1.1074 p-valor: 0.9606			Test de Levene: 0.1699 p-valor:0.9606		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	23.8741	5	4.7748	4.63	0.0139
Intra grupos	12.3875	12	1.0323		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	98.46	3	X		
3 meses	98.11	3	X	X	
6 meses	99.50	3	X		
9 meses	96.44	3		X	
12 meses	96.44	3		X	
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.82: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.2118

p-valor: 1.0

Contraste de Bartlett: 1.0186

p-valor: 0.9993

Contraste de Hartley: 1.6655

Test de Levene: 0.0369

p-valor: 0.9991

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	1669.29	5	333.857	369.88	0.0000
Intra grupos	10.8313	12	0.9026		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos
Inicial	98.81	3	X
1 mes	93.26	3	X
3 meses	86.05	3	X
6 meses	78.50	3	X
9 meses	74.21	3	X
12 meses	72.99	3	X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.83: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2871 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 1.4364		
Contraste de Bartlett: 1.0096 p-valor: 0.9959			Test de Levene: 0.0233 p-valor: 0.9948		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	437.209	3	145.736	187.38	0.0000
Intra grupos	6.222	8	0.7778		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	95.55	3		X	
3 meses	95.02	3		X	
6 meses	82.93	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.84: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4697 Contraste de Bartlett: 1.1392		p-valor: 0.5965 p-valor: 0.8344	Contraste de Hartley: 4.0994 Test de Levene: 0.2922 p-valor: 0.8300		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	3287.39	3	1095.8	2484.61	0.0000
Intra grupos	3.5283	8	0.4410		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	89.66	3		X	
3 meses	76.85	3			X
6 meses	54.72	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.85: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.5838 p-valor: 0.2885			Contraste de Hartley: 6.9034		
Contraste de Bartlett: 1.3228 p-valor: 0.6036			Test de Levene:0.6721 p-valor: 0.5928		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	9578.18	3	3192.73	8996.76	0.0000
Intra grupos	2.839	8	0.3549		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*		
Inicial	98.81	3	X		
1 mes	53.66	3		X	
3 meses	38.65	3			X
6 meses	23.18	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.86: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2651 Contraste de Bartlett: 1.1077			p-valor: 1.0 p-valor: 0.9603		
Contraste de Hartley: 3.7630 Test de Levene: 0.1870			p-valor: 0.9620		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	29.6606	5	5.9321	6.99	0.0028
Intra grupos	10.189	12	0.8491		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3	X X X X X X		
1 mes	95.37	3			
3 meses	96.40	3			
6 meses	95.39	3			
9 meses	95.02	3			
12 meses	95.58	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.87: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.2525
Contraste de Bartlett: 1.0507

p-valor: 1.0
p-valor: 0.9922

Contraste de Hartley: 2.2517
Test de Levene: 0.1138

p-valor: 0.9870

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	339.309	5	67.8617	110.13	0.0000
Intra grupos	7.3945	12	0.6162		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos
Inicial	98.81	3	X X X X X X X X X X X X X X X X
1 mes	95.38	3	
3 meses	94.25	3	
6 meses	96.38	3	
9 meses	93.43	3	
12 meses	84.94	3	

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.88: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

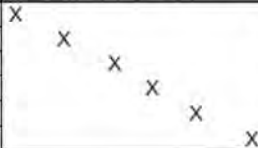
Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2488 Contraste de Bartlett: 1.0724			p-valor: 1.0 p-valor:0.9828		
			Contraste de Hartley: 2.6730 Test de Levene: 0.1395		
			p-valor:0.9796		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	1388.85	5	277.771	500.38	0.0000
Intra grupos	6.6615	12	0.5551		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	98.81	3			
1 mes	94.43	3			
3 meses	90.23	3			
6 meses	87.32	3			
9 meses	83.43	3			
12 meses	71.28	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.89: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2953 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.0207 p-valor: 0.9873			Contraste de Hartley: 1.7199 Test de Levene: 0.0479 p-valor:0.9851		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor*
Entre grupos	3.1945	3	1.0648	1.45	0.2989
Intra grupos	5.8714	8	0.7339		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.90: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.4208
Contraste de Bartlett: 1.0767

p-valor: 0.7773
p-valor: 0.9213

Contraste de Hartley: 2.6106
Test de Levene: 0.1754

p-valor: 0.9101

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	664.491	3	221.497	488.33	0.0000
Intra grupos	3.6287	8	0.4536		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos	
Inicial	101.30	3	X	
1 mes	102.12	3	X	
3 meses	97.17	3		X
6 meses	83.57	3		X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.91: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 Perialux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4139		p-valor: 0.8054		Contraste de Hartley: 2.4893	
Contraste de Bartlett: 1.0664		p-valor: 0.9349		Test de Levene: 0.1600	
				p-valor: 0.9203	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	4434.44	3	1478.15	1727.41	0.0000
Intra grupos	6.8456	8	0.8557		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	101.30	3	X	X	X
1 mes	66.25	3			
3 meses	61.11	3			
6 meses	49.86	3			
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.92: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2012		p-valor: 1.0	Contraste de Hartley: 1.6491		
Contraste de Bartlett: 1.0217		p-valor: 0.9989	Test de Levene: 0.0477 p-valor:0.9983		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	5.2224	5	1.0445	1.65	0.2206
Intra grupos	7.5887	12	0.6324		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.93: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3243		p-valor: 0.8452		Contraste de Hartley: 4.0216	
Contraste de Bartlett: 1.1191		p-valor: 0.9514		Test de Levene: 0.1673 p-valor:0.9514	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	5.0859	5	1.0172	1.28	0.3344
Intra grupos	9.5349	12	0.7946		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.94: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 Perlux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3128		p-valor: 0.9196	Contraste de Hartley: 64.2118		
Contraste de Bartlett: 2.0145		p-valor: 0.2179	Test de Levene: 0.7265 p-valor: 0.6167		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	54.3979	5	10.8796	21.73	0.0000
Intra grupos	6.0081	12	0.5007		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	101.30	3	X		
1 mes	101.48	3	X		
3 meses	102.42	3	X		
6 meses	101.69	3	X		
9 meses	99.16	3		X	
12 meses	97.39	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.95: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la riqueza de Equilina para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.5 Resultados estadísticos para el perfil estrogénico EQ/ES

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3636
Contraste de Bartlett: 1.1227

p-valor: 1.0
p-valor: 0.8575

Contraste de Hartley: 4.0
Test de Levene: 0.1429

p-valor: 0.9314

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0048	3	0.0016	17.18	0.0007
Intra grupos	0.0007	8	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos			
Inicial	0.43	3	X			
1 mes	0.42	3	X	X		
3 meses	0.41	3		X		
6 meses	0.38	3				X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.96: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3750		p-valor: 0.9766		Contraste de Hartley: 3.0	
Contraste de Bartlett: 1.1547		p-valor: 0.8128		Test de Levene: 0.33333	
				p-valor: 0.8018	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0053	3	0.0018	26.46	0.0002
Intra grupos	0.0005	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.43	3	X		
1 mes	0.42	3	X		
3 meses	0.42	3	X		
6 meses	0.38	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.97: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*						
Contraste C de Cochran: 0.6563		p-valor: 0.1625		Contraste de Hartley: 21.0		
Contraste de Bartlett: 1.7457		p-valor: 0.2971		Test de Levene: 0.6482		
				p-valor: 0.6058		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.						
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor	
Entre grupos	0.1448	3	0.0483	180.95	0.0000	
Intra grupos	0.0021	8	0.0003			
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.						
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***						
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos			
Inicial	0.43	3	X			
1 mes	0.27	3			X	
3 meses	0.20	3				X
6 meses	0.13	3				X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.						

Tabla 6.98: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.5		p-valor: 0.1875		Contraste de Hartley: 9.0	
Contraste de Bartlett: 1.4423		p-valor: 0.5965		Test de Levene: 0.2857	
				p-valor: 0.9120	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0006	5	0.0001	1.20	0.3660
Intra grupos	0.0012	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.99: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2222		p-valor: 1.0000		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.0911		p-valor: 0.9719		Test de Levene: 0.0833	
				p-valor: 0.9683	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0010	5	0.0002	1.96	0.1583
Intra grupos	0.0012	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.100: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 Perfalux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3182		p-valor: 0.8841		Contraste de Hartley: 7.0	
Contraste de Bartlett: 1.1580		p-valor: 0.9161		Test de Levene: 0.1714	
p-valor: 0.9683					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0603	5	0.0121	98.69	0.0000
Intra grupos	0.0015	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.43	3	X		
1 mes	0.39	3	X		
3 meses	0.36	3	X X		
6 meses	0.37	3	X		
9 meses	0.30	3	X		
12 meses	0.25	3	X		
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.101: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.375		p-valor: 0.9766		Contraste de Hartley: 3.0	
Contraste de Bartlett: 1.1547		p-valor: 0.8128		Test de Levene: 0.3333	
				p-valor: 0.8018	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0053	3	0.0018	26.46	0.0002
Intra grupos	0.0005	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.43	3	X		
1 mes	0.42	3	X		
3 meses	0.42	3	X		
6 meses	0.38	3		X	
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.102: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.5833

Contraste de Bartlett: 1.4014

p-valor: 0.2894

p-valor: 0.5202

Contraste de Hartley: 7.0

Test de Levene: 0.6111

p-valor: 0.6265

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0461	3	0.0154	153.64	0.0000
Intra grupos	0.0008	8	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos			
Inicial	0.43	3	X			
1 mes	0.40	3		X		
3 meses	0.36	3			X	
6 meses	0.27	3				X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.103: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénica EQ/ES para la formulación 50/2 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.6
Contraste de Bartlett: 1.35015

p-valor: 0.256
p-valor: 0.574969

Contraste de Hartley: 7.0
Test de Levene: 0.380952

p-valor: 0.769592

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0799333	3	0.0266444	91.35	0.0000
Intra grupos	0.00233333	8	0.000291667		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*			
Inicial	0.43	3	X			
1 mes	0.36	3		X		
3 meses	0.30	3			X	
6 meses	0.21	3				X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.104: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.28		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 7.0	
Contraste de Bartlett: 1.1987		p-valor: 0.8734		Test de Levene: 0.2615	
				p-valor: 0.9256	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0002	5	0.0000	0.26	0.9286
Intra grupos	0.0017	12	0.0001		
**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.105: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3077		p-valor: 0.9542		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.1924		p-valor: 0.8803		Test de Levene: 0.2 p-valor: 0.9563	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0045	5	0.0009	12.55	0.0002
Intra grupos	0.0009	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.43	3	X		
1 mes	0.42	3	X		
3 meses	0.42	3	X		
6 meses	0.43	3	X		
9 meses	0.42	3	X		
12 meses	0.38	3	X		
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.106: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/2 Perfalux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3182

Contraste de Bartlett: 1.1580

p-valor:0.8841

p-valor:0.9161

Contraste de Hartley: 7.0

Test de Levene: 0.1714

p-valor: 0.9683

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0603	5	0.0121	98.69	0.0000
Intra grupos	0.0015	12	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos
Inicial	0.43	3	<div> <div>X</div> <div>X</div> <div>X X</div> <div>X</div> <div>X</div> <div>X</div> </div>
1 mes	0.39	3	
3 meses	0.37	3	
6 meses	0.35	3	
9 meses	0.30	3	
12 meses	0.25	3	

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.107: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.5714		p-valor: 0.3149		Contraste de Hartley: 16.0	
Contraste de Bartlett: 1.5215		p-valor: 0.4270		Test de Levene: 0.2778	
				p-valor: 0.8400	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0000	3	0.0000	0.04	0.9903
Intra grupos	0.0019	8	0.0002		
** p-valor superior a 0,05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.108: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3684
Contraste de Bartlett: 1.2695

p-valor: 1.0
p-valor: 0.6640

Contraste de Hartley: 7.0
Test de Levene: 0.3333

p-valor: 0.8018

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0138	3	0.0046	29.11	0.0001
Intra grupos	0.0013	8	0.0002		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*	
Inicial	0.44	3	X	X
1 mes	0.45	3	X	
3 meses	0.42	3		X
6 meses	0.36	3		X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.109: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico para la formulación 52/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4375		p-valor: 0.7119		Contraste de Hartley: 7.0	
Contraste de Bartlett: 1.2296		p-valor: 0.7130		Test de Levene: 0.2222	
				p-valor: 0.8783	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0619	3	0.0206	154.83	0.0000
Intra grupos	0.0011	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*		
Inicial	0.44	3	X		
1 mes	0.31	3		X	
3 meses	0.29	3			X
6 meses	0.24	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.110: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.33333 Contraste de Bartlett: 1.2599	p-valor: 0.7901 p-valor: 0.8031				
Contraste de Hartley: 4.0 Test de Levene: 0.13333					
p-valor: 0.9815					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0005	5	0.0001	1.35	0.3090
Intra grupos	0.0008	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.111: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico EQ/ES para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.25		p-valor: 1.0	Contraste de Hartley: 3.0		
Contraste de Bartlett: 1.0940		p-valor: 0.9700	Test de Levene: 0.06 p-valor: 0.9970		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0775	5	0.0155	1.18	0.3736
Intra grupos	0.0024	12	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.112: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénica EQ/ES para la formulación 52/1 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.25		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.1648		p-valor: 0.9093		Test de Levene: 0.1333	
				p-valor: 0.9815	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0006	5	0.0001	1.41	0.2881
Intra grupos	0.0011	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.113: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénica EQ/ES para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.6 Resultados estadísticos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4286		p-valor: 0.9796		Contraste de Hartley: 3.0	
Contraste de Bartlett: 1.1218		p-valor: 0.7543		Test de Levene: 1.2222	
				p-valor: 0.3630	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.052	3	0.0173	297.14	0.0000
Intra grupos	0.0005	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.28	3	X	X	
3 meses	0.27	3		X	
6 meses	0.13	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.114: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.45		p-valor: 0.6655		Contraste de Hartley: 9.0	
Contraste de Bartlett: 1.348		p-valor: 0.5767		Test de Levene: 0.2619	
				p-valor: 0.8510	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1276	3	0.0425	255.12	0.0000
Intra grupos	0.0013	8	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.12	3		X	
3 meses	0.05	3			X
6 meses	0.03	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.115: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para la el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 PerlaLux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4737		p-valor: 0.8310		Contraste de Hartley: 3.0	
Contraste de Bartlett: 1.1036		p-valor: 0.7851		Test de Levene: 0.6154	
p-valor: 0.6241					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1678	3	0.0559	353.26	0.0000
Intra grupos	0.0013	8	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.04	3	X		
3 meses	0.02	3	X X		
6 meses	0.00	3	X		
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.116: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3077		p-valor: 0.9542		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.1924		p-valor: 0.8803		Test de Levene: 0.2	
				p-valor: 0.9563	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0010	5	0.0002	2.89	0.0611
Intra grupos	0.0009	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos..					

Tabla 6.117: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2222		p-valor: 1.0000		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.0911		p-valor: 0.9719		Test de Levene: 0.0833	
				p-valor: 0.9683	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0775	5	0.0155	77.51	0.0000
Intra grupos	0.0024	12	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.30	3	X		
3 meses	0.30	3	X		
6 meses	0.29	3	X		
9 meses	0.21	3		X	
12 meses	0.12	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.118: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3889			p-valor: 0.6974		
Contraste de Bartlett: 1.1913			p-valor: 0.8339		
Contraste de Hartley: 7.0			p-valor: 0.6740		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1696	5	0.0339	339.20	0.0000
Intra grupos	0.0012	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.06	3		X	
3 meses	0.05	3		X	
6 meses	0.04	3		X	X
9 meses	0.03	3			X
12 meses	0.00	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.119: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3913		p-valor: 0.9021		Contraste de Hartley: 3.0	
Contraste de Bartlett: 1.0966		p-valor: 0.8941		Test de Levene: 0.0784	
p-valor: 0.9699					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0651	3	0.0217	113.28	0.0000
Intra grupos	0.0015	8	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.27	3	X		
3 meses	0.20	3		X	
6 meses	0.10	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.120: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.4

p-valor: 0.8640

Contraste de Bartlett: 1.25

p-valor: 0.6875

Contraste de Hartley: 4.0

Test de Levene: 0.13333

p-valor:0.9375

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1232	3	0.0411	492.90	0.0000
Intra grupos	0.0007	8	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*			
Inicial	0.29	3	X			
1 mes	0.09	3		X		
3 meses	0.05	3				X
6 meses	0.04	3				X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.121: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 Perilux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.5	p-valor: 1.0	Contraste de Hartley: 1.0	
Contraste de Bartlett: 1.0	p-valor: 1.0	Test de Levene: 0.6667	p-valor: 0.5957

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1722	3	0.0574	860.79	0.0000
Intra grupos	0.0005	8	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos
Inicial	0.29	3	X
1 mes	0.04	3	X
3 meses	0.00	3	X
6 meses	0.00	3	X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.122: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3104	p-valor: 0.9361	Contraste de Hartley: 1.2115	
Contraste de Bartlett: 1.2115	p-valor: 0.8591	Test de Levene: 0.136	p-valor: 0.9807

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0035	5	0.0007	4.30	0.0178
Intra grupos	0.0019	12	0.0002		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos*
Inicial	0.29	3	X
1 mes	0.29	3	X
3 meses	0.30	3	X
6 meses	0.28	3	X
9 meses	0.28	3	X
12 meses	0.25	3	X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.123: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.3214

Contraste de Bartlett: 1.2272

p-valor: 0.8632

p-valor: 0.8412

Contraste de Hartley: 9.0

Test de Levene: 0.1546

p-valor: 0.9746

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1311	5	0.0262	168.60	0.0000
Intra grupos	0.0019	12	0.0002		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.28	3	X	X	
3 meses	0.27	3	X	X	
6 meses	0.26	3		X	
9 meses	0.19	3			X
12 meses	0.05	3			X

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.124: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3333		p-valor: 0.7901		Contraste de Hartley: 1.8461E30	
Contraste de Bartlett: 96756.		p-valor: 0.0		Test de Levene: 0.5 p-valor: 0.7708	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.1718	5	0.0344	515.33	0.0000
Intra grupos	0.0008	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.29	3	X		
1 mes	0.05	3		X	
3 meses	0.04	3		X	X
6 meses	0.03	3			X
9 meses	0.01	3			X
12 meses	0.01	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.125: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.3636		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 4.0	
Contraste de Bartlett: 1.227		p-valor: 0.8575		Test de Levene: 0.1429	
				p-valor: 0.9314	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0005	3	0.0002	1.94	0.2018
Intra grupos	0.0007	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.126: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4375		p-valor: 0.7119		Contraste de Hartley: 7.0	
Contraste de Bartlett: 1.2296		p-valor: 0.7130		Test de Levene: 0.2222	
p-valor: 0.8783					
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0102	3	0.0034	25.50	0.0002
Intra grupos	0.0011	8	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.28	3	X		
1 mes	0.26	3	X		
3 meses	0.23	3		X	
6 meses	0.21	3			X
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.127: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*

Contraste C de Cochran: 0.4375
Contraste de Bartlett: 1.2296

p-valor: 0.7119
p-valor: 0.7130

Contraste de Hartley: 7.0
Test de Levene: 0.2222

p-valor: 0.8783

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.3636	3	0.0121	90.90	0.0000
Intra grupos	0.0011	8	0.0001		

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***

Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos	
Inicial	0.28	3	X	
1 mes	0.18	3		X
3 meses	0.17	3		X
6 meses	0.14	3		

*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6.128: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2727		p-valor: 1.0		Contraste de Hartley: 9.0	
Contraste de Bartlett: 1.2584		p-valor: 0.7514		Test de Levene: 0.424	
				p-valor: 0.8234	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0012	5	0.0002	1.27	0.3395
Intra grupos	0.0022	12	0.0002		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.129: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénico DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.4286		p-valor: 0.5331		Contraste de Hartley: 9.0	
Contraste de Bartlett: 1.4722		p-valor: 0.5213		Test de Levene: 0.5867	
				p-valor: 0.7105	
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0006	5	0.0001	0.96	0.4780
Intra grupos	0.00114	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					

Tabla 6.130: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénica DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 Perialux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

Test de contraste de varianza*					
Contraste C de Cochran: 0.2667 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 4.0		
Contraste de Bartlett: 1.25 p-valor: 0.8148			Test de Levene: 0.12 p-valor: 0.9853		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.					
Valores ANOVA para % de Estrona según el tiempo**					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0.0049	5	0.0010	11.64	0.0003
Intra grupos	0.001	12	0.0001		
** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.					
Contraste Múltiple de rango para % Estrona según Tiempo***					
Tiempo	Media	Frecuencia	Grupos homogéneos		
Inicial	0.28	3	X		
1 mes	0.26	3		X	
3 meses	0.25	3		X	
6 meses	0.26	3		X	
9 meses	0.23	3		X	
12 meses	0.25	3	X		
*** X en la misma columna indica que entre los grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.					

Tabla 6.131: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para el perfil estrogénica DihidroEQ/ES para la formulación 52/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.5.3.7 Resultados estadísticos para el ensayo de velocidad de disolución

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.4270 p-valor: 0.4175 Contraste de Bartlett: 1.1407 p-valor: 0.4879			Contraste de Hartley: 4.4608 Test de Levene: 4.4608 p-valor: 0.1437		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	27.3626	3	9.1209	1.46	0.2558	
Intra grupos	125.032	20	6.2516			
%Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2925 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.0106 p-valor: 0.9786			Contraste de Hartley: 1.4202 Test de Levene: 0.1654 p-valor: 0.9185		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	48.006	3	16.002	2.41	0.0975	
Intra grupos	133.042	20	6.6521			
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.4097 p-valor: 0.4980 Contraste de Bartlett: 1.0979 p-valor: 0.6316			Contraste de Hartley: 3.4610 Test de Levene: 0.8875 p-valor: 0.4645		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	51.4561	3	17.152	2.86	0.0626	
Intra grupos	119.922	20	5.9961			

* valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

** p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.132: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2605 p-valor: 0.9456 Contraste de Bartlett: 1.1017 p-valor: 0.7468			Contraste de Hartley: 3.4656 Test de Levene: 2.0949 p-valor: 0.0937		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	36.3674	5	7.2735	1.12	0.3699
	Intra grupos	194.437	30	6.4812		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2523 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.1450 p-valor: 0.5830			Contraste de Hartley: 5.5321 Test de Levene: 0.7491 p-valor: 0.5932		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	76.369	5	15.2738	1.62	0.1845
	Intra grupos	282.455	30	9.4152		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2597 p-valor: 0.9551 Contraste de Bartlett: 1.0965 p-valor: 0.7667			Contraste de Hartley: 3.0453 Test de Levene: 1.2775 p-valor: 0.2994		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	6.6799	5	1.3360	0.30	0.9076
	Intra grupos	132.584	30	4.4195		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.133: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2685 p-valor: 0.8544 Contraste de Bartlett: 1.0717 p-valor: 0.8592			Contraste de Hartley: 0.9407 Test de Levene: 0.9407 p-valor: 0.4691		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	31.7142	5	6.3428	1.71	0.1625
	Intra grupos	111.212	30	3.7071		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2251 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.0500 p-valor: 0.9289			Contraste de Hartley: 2.6462 Test de Levene: 0.3434 p-valor: 0.8824		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	42.7858	5	8.5572	1.94	0.1173
	Intra grupos	132.46	30	4.4153		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.2470 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.0800 p-valor: 0.8291			Contraste de Hartley: 2.9854 Test de Levene: 0.7500 p-valor: 0.5926		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	21.6049	5	4.3210	1.06	0.4009
	Intra grupos	122.096	30	4.0699		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.134: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/1 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.416279 p-valor: 0.0859078 Contraste de Bartlett: 1.2448 p-valor: 0.297063			Contraste de Hartley: 6.72368 Test de Levene: 0.728113 p-valor: 0.607853		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	20.8361	5	4.16722	0.97	0.4519
	Intra grupos	128.89	30	4.29633		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.252306 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.14504 p-valor: 0.582984			Contraste de Hartley: 5.53214 Test de Levene: 0.74906 p-valor: 0.593243		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	76.369	5	15.2738	1.62	0.1845
	Intra grupos	282.455	30	9.41517		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.305416 p-valor: 0.518726 Contraste de Bartlett: 1.13338 p-valor: 0.625635			Contraste de Hartley: 4.44661 Test de Levene: 1.17058 p-valor: 0.346551		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	24.4772	5	4.89544	0.91	0.4847
	Intra grupos	160.528	30	5.35094		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.135: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/1 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.257795 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.00106 p-valor: 0.999281			Contraste de Hartley: 1.11835 Test de Levene: 0.0836076 p-valor: 0.968193		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	28.4211	3	9.50703	2.35	0.1033
	Intra grupos	80.9989	20	4.04995		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.332819 p-valor: 0.996762 Contraste de Bartlett: 1.05411 p-valor: 0.807796			Contraste de Hartley: 2.06296 Test de Levene: 0.815528 p-valor: 0.500348		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	66.0646	3	22.0215	2.46	0.0913
	Intra grupos	17.183	20	8.90913		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.293462 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.00484 p-valor: 0.993099			Contraste de Hartley: 1.27899 Test de Levene: 0.0619596 p-valor: 0.979259		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	72.0237	3	24.0079	2.42	0.0966
	Intra grupos	198.271	20	9.91357		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.136: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/2 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.313992 p-valor: 0.458817			Contraste de Hartley: 9.55626		
	Contraste de Bartlett: 1.22981 p-valor: 0.330497			Test de Levene: 1.7757 p-valor: 0.14813		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	46.7812	5	9.35625	1.68	0.1687
	Intra grupos	166.604	30	5.55347		
% Estróna a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.22869 p-valor: 1.0			Contraste de Hartley: 2.3141		
	Contraste de Bartlett: 1.04703 p-valor: 0.937059			Test de Levene: 0.657776 p-valor: 0.658039		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	56.4752	5	11.295	1.31	0.2876
	Intra grupos	259.314	30	8.64379		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.258917 p-valor: 0.964408			Contraste de Hartley: 2.19965		
	Contraste de Bartlett: 1.04465 p-valor: 0.943339			Test de Levene: 0.111899 p-valor: 0.988834		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	79.9896	5	15.9979	2.14	0.0883
	Intra grupos	224.725	30	7.49085		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.137: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/2 Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.278993 p-valor: 0.74477 Contraste de Bartlett: 1.06862 p-valor: 0.869845			Contraste de Hartley: 3.06839 Test de Levene: 0.623702 p-valor: 0.68284		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	39.3916	5	7.27833	1.36	0.2681
	Intra grupos	160.863	30	5.36211		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.293009 p-valor: 0.616635 Contraste de Bartlett: 1.04982 p-valor: 0.929341			Contraste de Hartley: 2.33821 Test de Levene: 0.711683 p-valor: 0.619429		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	36.5215	5	7.30429	1.08	0.3899
	Intra grupos	202.391	30	6.74638		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.235381 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.03162 p-valor: 0.972605			Contraste de Hartley: 1.93902 Test de Levene: 0.216894 p-valor: 0.952547		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	26.6809	5	5.33618	0.65	0.6654
	Intra grupos	247.196	30	8.23986		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.138: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/2 Perilux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.23795 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.0612 p-valor: 0.894709			Contraste de Hartley: 2.98321 Test de Levene: 0.295155 p-valor: 0.911792		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	106.046	5	21.2092	2.45	0.0561
	Intra grupos	259.44	30	8.64802		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.347711 p-valor: 0.276004 Contraste de Bartlett: 1.15801 p-valor: 0.537468			Contraste de Hartley: 5.78895 Test de Levene: 1.56885 p-valor: 0.19902		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	58.6305	5	11.7261	2.06	0.0981
	Intra grupos	170.551	30	5.68503		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.293711 p-valor: 0.610722 Contraste de Bartlett: 1.20319 p-valor: 0.397994			Contraste de Hartley: 5.03407 Test de Levene: 0.849298 p-valor: 0.526004		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	31.9541	5	6.39082	0.97	0.4531
	Intra grupos	198.104	30	6.60346		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.139: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 50/2 PVC-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.375359 p-valor: 0.691367 Contraste de Bartlett: 1.05611 p-valor: 0.799342			Contraste de Hartley: 2.45571 Test de Levene: 0.482428 p-valor: 0.698204		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	2.29895	3	0.766315	0.23	0.8737
Intra grupos	66.3362	20	3.31681			
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.352767 p-valor: 0.829771 Contraste de Bartlett: 1.04417 p-valor: 0.849952			Contraste de Hartley: 2.22079 Test de Levene: 0.267704 p-valor: 0.84788		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	14.853	3	4.95102	1.08	0.3809
Intra grupos	91.8564	20	4.59282			
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.342166 p-valor: 0.923157 Contraste de Bartlett: 1.05477 p-valor: 0.805011			Contraste de Hartley: 2.0404 Test de Levene: 1.15676 p-valor: 0.350806		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	7.25458	3	2.41819	0.79	0.5151
Intra grupos	61.4274	20	3.07137			

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.140: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.429753 p-valor: 0.405582			Contraste de Hartley: 3.3913		
	Contraste de Bartlett: 1.15248 p-valor: 0.453981			Test de Levene: 1.15028 p-valor: 0.353194		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	10.7981	3	3.59937	1.24	0.3207
	Intra grupos	57.94	20	2.897		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.430822 p-valor: 0.401037			Contraste de Hartley: 6.80427		
	Contraste de Bartlett: 1.26648 p-valor: 0.22499			Test de Levene: 2.32169 p-valor: 0.105968		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	1.14843	3	0.382811	0.10	0.9584
	Intra grupos	76.6405	20	3.78202		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.377432 p-valor: 0.678392			Contraste de Hartley: 17.2445		
	Contraste de Bartlett: 1.51904 p-valor: 0.052203			Test de Levene: 1.23312 p-valor: 0.323855		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	16.9853	3	5.66175	1.53	0.2367
	Intra grupos	73.8578	20	3.69289		
*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.						
**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.						

Tabla 6.141: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 52/1 Perlalux y la temperatura de 40 °C y 75% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.376418 p-valor: 0.173183 Contraste de Bartlett: 1.28366 p-valor: 0.224322			Contraste de Hartley: 8.5351 Test de Levene: 1.79882 p-valor: 0.143301		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	8.52446	5	1.70489	0.77	0.5766
	Intra grupos	66.1495	30	2.20498		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.321195 p-valor: 0.413046 Contraste de Bartlett: 1.33281 p-valor: 0.156416			Contraste de Hartley: 12.2157 Test de Levene: 2.17731 p-valor: 0.0081969		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	15.5723	5	3.11446	0.92	0.4810
	Intra grupos	101.457	30	3.38191		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.236977 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.17395 p-valor: 0.484724			Contraste de Hartley: 7.21306 Test de Levene: 1.549 p-valor: 0.204706		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	10.4509	5	2.09017	0.61	0.6928
	Intra grupos	102.787	30	3.42623		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.142: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 52/1 Alu-Alu y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.235888 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.13487 p-valor: 0.620117			Contraste de Hartley: 5.46335 Test de Levene: 0.641203 p-valor: 0.670071		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	11.0979	5	2.21959	0.55	0.7392
	Intra grupos	121.712	30	4.05705		
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.226924 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.04766 p-valor: 0.935346			Contraste de Hartley: 2.14857 Test de Levene: 0.209071 p-valor: 0.956046		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	8.02701	5	1.6054	1.04	0.4114
	Intra grupos	46.2198	30	1.54066		
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.251005 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.09149 p-valor: 0.785984			Contraste de Hartley: 3.48335 Test de Levene: 0.885965 p-valor: 0.502642		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	58.1031	5	11.6206	2.44	0.0597
	Intra grupos	142.605	30	4.7535		

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.143: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 52/1 PerlaLux y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

% Estrona a las 2 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.222802 p-valor: 1.0 Contraste de Bartlett: 1.15748 p-valor: 0.539276			Contraste de Hartley: 6.37322 Test de Levene: 0.874068 p-valor: 0.510145		
	Valores ANOVA para % Disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	12.5342	5	2.50685	0.58	0.7121
Intra grupos	128.815	30	4.29385			
% Estrona a las 5 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.278552 p-valor: 0.749128 Contraste de Bartlett: 1.11915 p-valor: 0.67943			Contraste de Hartley: 3.31433 Test de Levene: 0.443602 p-valor: 0.814421		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	13.9801	5	2.79602	0.72	0.6157
Intra grupos	116.989	30	3.89965			
% Estrona a las 8 horas	Test de contraste de varianza*					
	Contraste C de Cochran: 0.293037 p-valor: 0.616398 Contraste de Bartlett: 1.0984 p-valor: 0.759461			Contraste de Hartley: 3.9629 Test de Levene: 0.900914 p-valor: 0.493321		
	Valores ANOVA para % disuelto de Estrona según el tiempo**					
	Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
	Entre grupos	37.8343	5	7.56686	1.53	0.2104
Intra grupos	148.411	30	4.94704			

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

*valores de p-valor superiores o iguales a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones típicas de los grupos y por lo tanto se puede aplicar un estudio ANOVA.

**p-valor superior a 0.05 indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 6.144: Estudio estadístico de la varianza de una sola vía de los resultados obtenidos para ensayo de velocidad de disolución para la formulación 52/1 PVC-ALU y la temperatura de 25 °C y 60% HR.

6.6 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD

6.6.1 Aspecto

Los resultados obtenidos en el ensayo de Aspecto se encuentran en las tablas de la 6.6 a la 6.23. Los resultados pertenecientes a las formulaciones estudiadas (formulación 50/1, 50/2 y 52/1) acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento (alu-alu, perlalux, pvc-alu) reflejan que las muestras conservan un aspecto correcto sin observarse diferencias con las especificaciones durante el ensayo a corto y largo plazo. Por tanto se puede concluir que las muestras mantienen las características relativas al aspecto intactas a lo largo del estudio a corto y largo plazo

para las tres formulaciones acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento.

6.6.2 Ensayo de humedad

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo de humedad en los comprimidos de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En los gráficos 1 y 2 para la formulación 50/1, en los gráficos 15 y 16 para la formulación 50/2 y en los gráficos 29 y 30 para la formulación 52/1 se representa la variación del ensayo de humedad en el tiempo para cada tipo de material de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación.

6.6.2.1 Estudio a corto plazo

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio llevado a cabo a corto plazo. En las tablas 6.24, 6.25 y 6.26 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo. Para las muestras acondicionadas en PVC-Alu se presentan diferencias estadísticamente significativas al primer mes de iniciado el estudio a corto plazo.

Se puede concluir que los materiales de acondicionamiento ALU-ALU y Perlalux consiguen proteger totalmente a las muestras de las condiciones del ensayo a corto plazo.

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a corto plazo. En las tablas 6.30, 6.31 y 6.32 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran

diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo.

Se puede concluir que las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se ven afectadas durante el estudio a corto plazo en lo referente a la humedad.

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a corto plazo. En las tablas 6.36, 6.37 y 6.38 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo.

Se puede concluir que las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se ven afectadas durante el estudio a corto plazo en lo referente a la humedad.

6.6.2.2 Estudio a largo plazo

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a largo plazo. En las tablas 6.27, 6.28 y 6.29 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

Se puede concluir que las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se ven afectadas durante el estudio a largo plazo en lo referente a la humedad.

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio a largo plazo. En las tablas 6.33, 6.34 y 6.35 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio a largo plazo.

Se puede concluir que las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se ven afectadas durante el estudio a largo plazo en lo referente a la humedad.

El ensayo de humedad de las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio a largo plazo. En las tablas 6.39, 6.40 y 6.41 se muestran el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de humedad de las muestras acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

Se puede concluir que las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se ven afectadas durante el estudio a largo plazo en lo referente a la humedad.

A partir de los resultados de los ensayos a corto y largo plazo se puede concluir que las tres formulaciones acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento excepto las muestras de la formulación 50/1 acondicionada en PVC-ALU mantienen las características en lo referente a la humedad.

6.6.3 Uniformidad de masa

En las tablas de la 6.6 a la 6.23 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de uniformidad de masa: valor medio de los 20 comprimidos ensayados, valor máximo y valor mínimo para cada formulación acondicionada en los tres materiales de

acondicionamiento primario para el ensayo a corto y largo plazo. En los gráficos 3 y 4 para la formulación 50/1, en los gráficos 17 y 18 para la formulación 50/2, en los gráficos 31 y 32 para la formulación 52/1 se muestran los valores medios para cada formulación acondicionada en los diferentes materiales de acondicionamiento primario en el estudio a corto y largo plazo conjuntamente con los límites del ensayo. Los resultados indican que durante el estudio de estabilidad, el ensayo de uniformidad de masa para todas las formulaciones acondicionadas y temperaturas permanece dentro de las especificaciones establecidas al inicio del estudio.

Al aplicar un análisis de la variancia de una sola vía (ANOVA), no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos durante el estudio de estabilidad, tal y como refleja los resultados presentados en las tablas 6.42 a la 6.59.

Se puede concluir que la masa de los comprimidos se mantiene intacta para las muestras de las tres formulaciones acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo.

6.6.4 Estudio del contenido en estrona

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo del contenido en estrona en los comprimidos de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En los gráficos 5 y 6 para la formulación 50/2, en los gráficos 19 y 20 para la formulación 50/2 y en los gráficos 33 y 34 para la formulación 52/1 se representa la variación del contenido de estrona en el tiempo para cada tipo de material de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación y el límite de cambio significativo.

6.6.4.1 Estudio a corto plazo

El contenido de estrona en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra durante todo el estudio a corto plazo dentro de las especificaciones mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones a los 6 meses y al primer mes de iniciar el estudio, respectivamente. En las tablas 6.60, 6.61 y 6.62 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas en ALU-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas

a los tres meses de iniciado el estudio mientras que para las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas se encuentran ya en el primer mes del estudio.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Perlalux y PVC-Alu no proporcionan suficiente protección a la formulación frente las condiciones del ensayo mientras que el material de acondicionamiento Alu-Alu protege más eficazmente manteniendo el contenido dentro de las especificaciones durante el ensayo a corto plazo aunque se observan diferencias estadísticamente significativas a los tres meses

El contenido en estrona en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra durante todo el ensayo dentro de los límites de las especificaciones mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones a los 6 meses y al primer mes de iniciar el ensayo, respectivamente. En las tablas 6.66, 6.67 y 6.68 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio a corto plazo mientras que para las muestras PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas se encuentran ya en el primer mes del estudio.

Se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Perlalux y PVC-Alu no proporcionan suficiente protección a la formulación 50/2 frente las condiciones del ensayo. El material de acondicionamiento Alu-Alu consigue proteger en lo referente al contenido en estrona completamente a la formulación 50/2 de las condiciones del ensayo a corto plazo.

El contenido de estrona en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en ALU-ALU y PERLALUX se encuentra durante todo el ensayo dentro de los límites de las especificaciones iniciales mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones a los 6 meses de iniciar el ensayo. En las tablas 6.72, 6.73 y 6.74 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para la muestras ALU-ALU no se encuentran

diferencias estadísticamente significativas en el estudio a corto plazo mientras que para las muestras PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas aparecen a los seis meses y en el primer mes del estudio a corto plazo, respectivamente.

Se puede concluir que el material de acondicionamiento PVC-Alu no proporcionan suficiente protección a la formulación 52/1 frente las condiciones externas mientras que el material de acondicionamiento Perlalux y Alu-Alu mantiene las muestras dentro de las especificaciones. En el caso del Perlalux aparecen diferencias estadísticamente significativas a los seis meses de iniciado el estudio mientras que en las muestras acondicionadas en Alu-Alu no aparecen diferencias estadísticamente durante el ensayo a corto plazo. El material de acondicionamiento Alu-Alu consigue proteger más eficazmente a las muestras de la formulación 52/1 frente a las condiciones del estudio a corto plazo.

6.6.4.2 Estudio a largo plazo

El contenido de estrona en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres tipos de material acondicionamiento primario se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de los límites de las especificaciones. En las tablas 6.63, 6.64 y 6.65 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo mientras que para las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas se encuentran ya en el tercer mes y primer mes de inicio del estudio, respectivamente.

Por tanto se puede concluir que el material de acondicionamiento Alu-Alu protege más eficazmente a las muestras de la formulación frente a la temperatura y humedad del ensayo durante el estudio a largo plazo.

El contenido de estrona en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento primario se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro las especificaciones. En las tablas 6.69, 6.70 y 6.71 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras

acondicionadas en ALU-ALU y Perlux no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo mientras que para las muestras de PVC-ALU las diferencias significativas se encuentran en el sexto mes del inicio del estudio.

Los resultados indican que los materiales de acondicionamiento Alu-Alu y Perlux protegen eficazmente a las muestras de la formulación 50/2 durante el estudio a corto plazo.

El contenido de estrona en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento primario se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de las especificaciones. En las tablas 6.75, 6.76 y 6.77 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados para las muestras acondicionadas en ALU-ALU y Perlux no presentan diferencias estadísticamente significativas en el estudio a largo plazo mientras que para las muestras PVC-ALU las diferencias significativas aparecen a los nueve meses del inicio del estudio.

Los resultados indican que los materiales de acondicionamiento Alu-Alu y Perlux protegen eficazmente a las muestras de la formulación 52/1 durante el estudio a largo plazo.

Los resultados del ensayo a corto y largo plazo indican que la formulación 52/1 presenta unas características más estables en lo referente al contenido en estrona que el resto de formulaciones. Los materiales de acondicionamiento más idóneos para la formulación 52/1 en lo referente al contenido en estrona son el Alu-Alu y Perlux.

6.6.5 Estudio del contenido en equilina

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo de riqueza en equilina en los comprimidos de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En los gráficos 7 y 8 para la formulación 50/2, en los gráficos 21 y 22 para la formulación 50/2 y en los gráficos 35 y 36 para la formulación 52/1 se representa la variación de la cantidad de equilina en el tiempo para cada tipo de

material de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación y el límite de cambio significativo.

6.6.5.1 Estudio a corto plazo

El contenido de equilina en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres tipos de acondicionamiento, se encuentra ya en el primer mes de iniciado el estudio fuera de las especificaciones. En las tablas 6.78, 6.79 y 6.80 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentran diferencias estadísticamente significativas ya en el primer mes de iniciado el estudio.

Se puede concluir que ninguno de los tres materiales consigue proteger a las muestras de la formulación 50/1 por lo que hace al contenido de equilina durante el ensayo a corto plazo.

El contenido en equilina en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra fuera de especificaciones a los seis meses de iniciado el estudio de estabilidad mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones al primer mes de iniciar el estudio. En las tablas 6.84, 6.85 y 6.86 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres tipos de acondicionamiento primario se encuentran diferencias estadísticamente significativas ya al primer mes de iniciado el estudio.

Se puede concluir que ninguno de los tres materiales consigue proteger a las muestras de la formulación 50/2 durante el estudio a corto plazo por lo que hace al contenido de equilina.

El contenido de equilina en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra durante todo el estudio dentro de las especificaciones mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentra fuera de las especificaciones a los 6 meses y al primer mes de iniciar el ensayo, respectivamente. En las tablas 6.90, 6.91 y 6.92 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento

primario. Los resultados de las muestras ALU-ALU no presentan diferencias estadísticamente significativas en el estudio a corto plazo mientras que para las muestras PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas aparecen al tercer mes y en el primer mes del inicio del estudio a corto plazo, respectivamente.

Los resultados indican que el material de acondicionamiento ALU-ALU consigue proteger totalmente a las muestras de la formulación 52/1 de las condiciones del ensayo mientras que los materiales de acondicionamiento Perlalux y PVC-Alu no protegen suficiente a las muestras durante el estudio a corto plazo.

6.6.5.2 Estudio a largo plazo

El contenido de equilina en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en PVC-Alu se encuentra fuera al primer mes de iniciado el estudio. En las tablas 6.81, 6.82 y 6.83 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo mientras que para las muestras acondicionadas en PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas se encuentran a los nueve meses y al primer mes del inicio del estudio, respectivamente.

Por tanto, se puede concluir que el material de acondicionamiento PVC-Alu y Perlalux no protege suficiente a las muestras de la formulación 50/1 mientras que el material de acondicionamiento Alu-alu consigue proteger a las muestras de las condiciones del estudio a largo plazo.

El contenido en equilina en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra durante todo el estudio dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentra fuera a los nueve meses y un mes de iniciado el estudio, respectivamente. En las tablas 6.87, 6.88 y 6.89 se muestran el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres

tipos de material de acondicionamiento primario se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el primer mes de iniciado el estudio a largo plazo.

Se puede concluir que el material de acondicionamiento PVC-Alu y Perlalux no protegen suficiente a las muestras, mientras que el material de acondicionamiento Alu-alu consigue mantener a las muestras dentro de especificaciones a lo largo de ensayo aunque se observan diferencias estadísticamente significativas.

El contenido de equilina en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento primario se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de las especificaciones. En las tablas 6.93, 6.94 y 6.95 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras ALU-ALU y Perlalux no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el estudio a largo plazo mientras que para las muestras PVC-ALU las diferencias significativas aparecen a los nueve meses de inicio del estudio.

Se puede concluir que el material de acondicionamiento PVC-Alu no protege suficiente a las muestras de la formulación 52/1 mientras que el material de acondicionamiento Perlalux y Alu-alu consiguen mantener a las muestras dentro de especificaciones a lo largo del estudio a largo plazo.

Los resultados del estudio de estabilidad a corto y largo plazo indican que la formulación 52/1 presenta unas características más estables en lo referente al contenido en equilina que el resto de formulaciones. El material de acondicionamiento más idóneo para la formulación 52/1 en lo referente al contenido en equilina son el Alu-Alu y Perlalux.

6.6.6 Perfil estrogénico EQ/ES

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo del perfil estrogénico EQ/ES de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En los gráficos 9 y 10 para la formulación 50/2, en los gráficos 23 y 24 para la formulación 50/2 y en los gráficos 37 y 38 para la formulación 52/1 se representa la variación en el ensayo del perfil de EQ/ES en el tiempo para cada tipo de material de

acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación.

6.6.6.1 Estudio a corto plazo

La relación entre la cantidad de Equilina frente la cantidad de Estrona en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU, se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentra fuera de las especificaciones a los seis meses y el primer mes de iniciado el estudio de estabilidad, respectivamente. En las tablas 6.96, 6.97 y 6.98 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en el caso de ALU-ALU y perlalux a los tres meses y en el caso de PVC-Alu ya en el primer mes de iniciado el estudio a corto plazo.

Se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Perlalux y Pvc-alu no consiguen proteger a las muestras de la formulación 50/1 de las condiciones del ensayo a corto plazo mientras que Alu-Alu consigue mantener a las muestras dentro de las especificaciones aunque se observan diferencias estadísticamente significativas.

El valor EQ/ES en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio de estabilidad mientras que los resultados de las muestras acondicionadas con Perlalux y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones al sexto y primer mes de iniciar el estudio, respectivamente. En las tablas 6.102, 6.103 y 6.104 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas ALU-ALU encuentran diferencias estadísticamente a los seis meses de iniciado el estudio mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en ambos casos, al primer mes de iniciado el estudio.

Se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Perlalux y Pvc-alu no consiguen proteger a las muestras de la formulación 50/2 de las condiciones del ensayo a corto plazo mientras que el Alu-Alu consigue mantener a las muestras dentro

de las especificaciones aunque se observan diferencias estadísticamente significativas.

El valor EQ/ES en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux se encuentra durante todo el estudio dentro de las especificaciones mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones al mes de iniciado el estudio. En las tablas 6.108, 6.109 y 6.110 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el estudio a corto plazo mientras que para las muestras PERLALUX y PVC-ALU las diferencias significativas aparecen al tercer mes y en el primer mes del inicio del estudio a corto plazo, respectivamente.

Se puede concluir que el material de acondicionamiento Alu-Alu consigue proteger totalmente a las muestras de la formulación 52/1 durante el estudio a corto plazo por lo que hace al valor EQ/ES.

6.6.7 Estudio a largo plazo

El ensayo de perfil estrogénico EQ/ES en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux se encuentran dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en PVC-ALU se encuentra fuera de especificaciones a los nueve meses de iniciado el estudio a largo plazo. En las tablas 6.99, 6.100 y 6.101 se muestran el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para las muestras acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux durante el estudio de estabilidad a largo plazo mientras que para las muestras acondicionadas en PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas al primer mes del inicio del estudio a largo plazo.

Por tanto, se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Alu-Alu y Perlalux protegen totalmente a las muestras de la formulación 50/1 mientras que el

material de acondicionamiento PVC-alu no consigue proteger a las muestras de las condiciones del estudio a largo plazo.

El ensayo de perfil estrogénico EQ/ES en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones a los nueve meses de iniciado el estudio. En las tablas 6.105, 6.106 y 6.107 se muestran el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentra diferencias estadísticamente significativas mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas a los doce meses y al primer mes de iniciado el estudio, respectivamente.

Los resultados indican que el material de acondicionamiento ALU-ALU y Perlalux consigue mantener el factor EQ/ES dentro de las especificaciones pero sólo las muestras acondicionadas en Alu-Alu no presentan diferencias estadísticamente significativas en lo referente al cociente EQ/ES.

El ensayo de perfil estrogénico EQ/ES en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentran dentro de las especificaciones. En las tablas 6.111, 6.112 y 6.113 se muestran el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres tipos de material de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

Los resultados indican que los tres materiales de acondicionamiento consiguen proteger totalmente a las muestras de la formulación 52/1 de las condiciones durante el estudio a largo plazo.

Los resultados del estudio de estabilidad a corto y largo plazo indican que la formulación 52/1 presenta unas características más estables en lo referente al valor del factor EQ/ES que el resto de formulaciones independientemente del material de acondicionamiento utilizado.

6.6.8 Perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En los gráficos 11 y 12 para la formulación 50/2, en los gráficos 25 y 26 para la formulación 50/2 y en los gráficos 39 y 40 para la formulación 52/1 se representa la variación en el ensayo de perfil de α -dihidroEQ/ES en el tiempo para cada tipo de material de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación.

6.6.8.1 Estudio a corto plazo

La relación entre la cantidad de α -dihidroEQ frente la cantidad de Estrona en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU, se encuentra fuera de las especificaciones a los seis meses de iniciado el estudio. En el caso de las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentra fuera de las especificaciones al primer mes del estudio de estabilidad a corto plazo. En las tablas 6.114, 6.115 y 6.116 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en el caso de ALU-ALU a los tres meses, en el caso de Perlalux y PVC-Alu ya en el primer mes de iniciado el estudio a corto plazo.

Se puede concluir que ninguno de los tres materiales consigue proteger a las muestras de la formulación 50/1 por lo que hace al ensayo de α -dihidroEQ/ES durante el estudio a corto plazo.

El ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra fuera de las especificaciones a los 3 meses del inicio del estudio de estabilidad mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones al primer mes de iniciar el estudio. En las tablas 6.120, 6.121 y 6.122 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas ALU-ALU se encuentran diferencias estadísticamente a los tres meses

de iniciado el estudio mientras que las muestras acondicionadas en Perlux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en ambos casos, al primer mes de iniciado el estudio.

Se puede concluir que ninguno de los tres materiales consigue proteger a las muestras de la formulación 50/2 por lo que hace al ensayo de α -dihidroEQ/ES durante el estudio a corto plazo.

El ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio de estabilidad mientras que los resultados de las muestras acondicionadas en Perlux y PVC-ALU se encuentran fuera de las especificaciones a los tres meses y al primer mes de iniciar el estudio. En las tablas 6.126, 6.127 y 6.128 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras acondicionadas ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente durante el estudio mientras que las muestras acondicionadas en Perlux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas a los tres meses y al primer mes de iniciado el estudio, respectivamente

Se puede concluir que el material de acondicionamiento Alu-Alu consigue proteger totalmente a las muestras de la formulación 52/1 por lo que hace al ensayo de α -dihidroEQ/ES durante el estudio a corto plazo.

6.6.8.2 Estudio a largo plazo

La relación entre la cantidad de α -dihidroEQ frente la cantidad de Estrona en las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en ALU-ALU se encuentran dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en Perlux y PVC-ALU se encuentra fuera de especificaciones a los nueve meses y al mes de iniciado el estudio a largo plazo, respectivamente. En las tablas 6.117, 6.118 y 6.119 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo mientras que las muestras acondicionadas en

Perlalux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas a los nueve meses y al primer mes del estudio de estabilidad, respectivamente.

Se puede concluir que el material de acondicionamiento Alu-Alu consigue proteger totalmente a las muestras de la formulación 50/1 por lo que hace al ensayo de α -dihidroEQ/ES durante el estudio a largo plazo.

El ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES en las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en ALU-ALU se encuentra durante todo el estudio a largo plazo dentro de las especificaciones mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentra fuera de las especificaciones a los nueve meses y al primer mes de iniciado el estudio, respectivamente. En las tablas 6.123, 6.124 y 6.125 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que las muestras acondicionadas en ALU-ALU existen diferencias estadísticamente significativas a los doce meses de iniciado mientras que las muestras acondicionadas en Perlalux y PVC-ALU se encuentran diferencias estadísticamente significativas a los seis meses y al primer mes de iniciado el estudio, respectivamente.

Se puede concluir que el material acondicionamiento Alu-Alu consigue mantener a las muestras de la formulación 50/2 dentro de las especificaciones aunque se observan diferencias estadísticamente significativas a los doce meses de iniciar el estudio a largo plazo.

El ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES en las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentran dentro de las especificaciones. En las tablas 6.129, 6.130 y 6.131 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. Los resultados indican que para las muestras ALU-ALU y Perlalux no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo, mientras que las muestras acondicionadas en PVC-ALU muestran diferencias estadísticamente al primer mes del inicio del estudio.

A partir de los resultados se puede concluir que los materiales de acondicionamiento Alu-Alu y Perlux protegen totalmente a las muestras de la formulación 52/1 de las condiciones del estudio a largo plazo por lo que hace al estrogénico α -dihidroEQ/ES.

Los resultados del ensayo a corto y largo plazo indican que la formulación 52/1 presenta unas características más estables en lo referente al ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES que el resto de formulaciones. Los materiales de acondicionamiento más idóneos para la formulación 52/1 en lo referente al ensayo de perfil estrogénico α -dihidroEQ/ES son el Alu-Alu y el Perlux.

6.6.9 Estudio del ensayo de velocidad de disolución

Los resultados obtenidos en el estudio a corto plazo y largo plazo para el ensayo de velocidad de disolución en los comprimidos de las tres formulaciones 50/1, 50/2 y 52/1 acondicionadas en los 3 tipos de material de acondicionamiento se presentan de la tabla 6.6 a la 6.23. En las muestras que el contenido en estrona se encuentra fuera de las especificaciones no se ha continuado el ensayo de disolución. En el gráfico 13 y 14 para la formulación 50/1, en el gráfico 27 y 28 para la formulación 50/2 y en el gráfico 41 y 42 para la formulación 52/1 se representa la variación del porcentaje disuelto en el tiempo para cada tipo de material de acondicionamiento durante el estudio de estabilidad a corto y largo plazo conjuntamente con la especificación.

6.6.9.1 Estudio a corto plazo

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en Alu-Alu se encuentra dentro de las especificaciones durante el estudio a corto plazo. Las muestras acondicionadas en Perlux se encuentran dentro de las especificaciones a los tres meses, el ensayo no se sigue a los 6 meses porque las muestras se encuentran fuera de las especificaciones por lo que hace al contenido de estrona. En el caso de las muestras acondicionadas en PVC-ALU no se sigue el ensayo ya que las muestras se encuentran fuera de las especificaciones para el contenido en estrona ya el primer mes del inicio del ensayo a corto plazo. En la tabla 6.132 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para las muestras acondicionadas en Alu-Alu. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo.

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en Alu-Alu se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a corto plazo mientras que para las muestras acondicionadas Perlalux y PVC-Alu el ensayo de disolución no se continua porque el contenido en estrona se encuentra fuera de las especificaciones al sexto y al primer mes del inicio del ensayo, respectivamente. En la tabla 6.136 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para las muestras acondicionadas en Alu-Alu. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en ALU-ALU no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo.

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en Alu-Alu y Perlalux se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a corto plazo mientras que el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en PVC-alu se interrumpe a los tres meses al encontrarse el ensayo de contenido en estrona fuera de las especificaciones. En las tablas 6.140 y 6.141 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para las muestras acondicionadas en Alu-Alu y perlalux. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en ALU-ALU y Perlalux no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a corto plazo.

Se puede concluir que las muestras de las tres formulaciones acondicionadas en ALU-ALU y la formulación 52/1 acondicionada en Perlalux no ven afectadas sus características de disolución durante el ensayo a corto plazo. En el resto de las muestras no se completa el estudio de disolución porque el contenido de estrona se encuentra fuera de las especificaciones.

6.6.9.2 Estudio a largo plazo

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 50/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de los límites de las especificaciones durante todo el estudio a largo plazo. En las tablas 6.133, 6.134 y 6.135 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se

encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 50/2 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de los límites de las especificaciones durante todo el estudio a largo plazo. En las tablas 6.137, 6.138 y 6.139 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

El ensayo de velocidad de disolución de las muestras de la formulación 52/1 acondicionadas en los tres tipos de material de acondicionamiento se encuentra dentro de las especificaciones durante todo el estudio a corto plazo. En las tablas 6.142, 6.143 y 6.144 se muestra el estudio estadístico ANOVA de los resultados para los tres materiales de acondicionamiento primario. En el ensayo de disolución de las muestras acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio de estabilidad a largo plazo.

Se puede concluir que las muestras acondicionadas en los tres materiales de acondicionamiento no ven afectadas sus características de disolución durante el estudio a largo plazo.

Los resultados del estudio de estabilidad a corto y largo plazo indican que la formulación 52/1 acondicionadas en los tres materiales y las formulaciones 50/1 y 50/2 acondicionadas en Alu-Alu mantienen las características de disolución intactas.

6.7 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Los comprimidos de la formulación 52/1 acondicionados en Alu-Alu mantienen todas las características físicas, galénicas y químicas intactas durante seis meses almacenados a 40 °C y 75% de humedad y doce meses almacenados a 25 °C y 60% de humedad con respecto a las especificaciones establecidas al inicio del estudio de

estabilidad a corto y largo plazo. La evaluación de los resultados en los ensayos considerados críticos demuestra la existencia de una buena formulación y de una tecnología adecuada.

Se puede concluir que la formulación 50/1 acondicionada en Alu-Alu y la formulación 52/1 acondicionada en perlalux mantienen intactas las características físicas, galénicas y químicas almacenadas 12 meses a 25 °C y 60% de humedad relativa pero no mantienen las características almacenadas 6 meses a 40 °C y 75% de humedad relativa. Por lo tanto sería necesario realizar el estudio intermedio analizando estas muestras en las condiciones de 30 °C y 60% de humedad relativa durante 12 meses antes de descartarlas como formulaciones viables.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

1. La investigación realizada ha hecho posible obtener un nuevo medicamento estrogénico de acción prolongada en el tiempo, estable y de calidad.
2. Se propone como formulación óptima para la obtención de los comprimidos de estrógenos conjugados la siguiente (formulación 52):

Estrógenos conjugados (título 56.5%)	0.625 mg
Hipromelosa (Metolosa 4000 SR)	45 mg
Celulosa microcristalina (Avicel pH 101)	68.82 mg
Polivinilpirrolidona (PVP K30)	14 mg
Lactosa monohidrato (Tablettosa 80)	43.00 mg
Almidon maíz	23.67 mg
Glicolato sódico de almidón (Primojel)	2.5 mg
Silice coloidal (Cabosil)	0.4 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg
Peso comprimido	200 mg

Recubrimiento:

Hidroxipropilmetilcelulosa (Pharmacoat 606).....	88 g
Dióxido de titanio.....	20.5 g
Rojo Sicopharm 30.....	17.5 g
Agua csp	1000 ml
Aumento de peso	2%

3. La formulación obtenida presenta unas características adecuadas a las normas de calidad exigibles a un medicamento.
4. La materia prima de estrógenos conjugados de proveedor Diosinth, cumple con las especificaciones de Real Farmacopea Española 3^{era} Ed., Farmacopea Europea 5^a Ed., concluyéndose que es apta y adecuada para el desarrollo de las formulaciones.
5. El nuevo medicamento desarrollado cumple con las especificaciones de la Real Farmacopea Española 3^{era} Ed. y Farmacopea Europea 5^a Ed. y con el perfil de disolución de la Farmacopea de los Estados Unidos USP 29 para los comprimidos que contienen 0.625 mg de estrógenos conjugados.
6. Se propone una nueva metodología analítica para el análisis cuantitativo de los estrógenos principales (Estrona sulfato sódico y Equilina sulfato sódico) y los tres componentes concomitantes (17 α -dihidroequilina sulfato sódico, 17 β -dihidroequilina y 17 α -estradiol) en la materia prima por cromatografía líquida de alta resolución con previa hidrólisis química.
7. La metodología analítica propuesta para los estrógenos principales en la materia prima ha sido validada concluyéndose que es selectiva, lineal, precisa y exacta en el intervalo entre el 80% y el 120% de la concentración de trabajo.
8. Se propone una nueva metodología analítica para el análisis cuantitativo de las impurezas descritas en las farmacopeas (17 β -estradiol sulfato sódico, 17 α -dihidroequilenina sulfato sódico, 17 β -dihidroequilenina sulfato sódico y equilenina sulfato sódico) en la materia prima por cromatografía líquida de alta resolución con previa hidrólisis química.

9. La metodología analítica propuesta para las impurezas en la materia prima ha sido validada concluyéndose que es adecuadamente selectiva, lineal, precisa y exacta en el intervalo entre el 50% y el 120% de la especificación límite fijada en las farmacopeas.
10. Se propone una nueva metodología analítica para el análisis cuantitativo de equilina sulfato sódico y estrona sulfato sódico por cromatografía de alta resolución para el producto acabado.
11. La metodología analítica propuesta para la valoración del contenido en estrona sulfato sódico y equilina sulfato sódico en el producto acabado ha sido validada concluyéndose que es selectiva, lineal, precisa y exacta en el intervalo entre el 50% y el 150% de la concentración de trabajo para las dos sustancias cuantificadas.
12. Se concluye que el material de acondicionamiento primario Aluminio-Aluminio es el único suficientemente válido para proteger al medicamento durante el ensayo de estabilidad y, en consecuencia, durante su tiempo de caducidad.
13. Los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad a corto plazo (6 meses a 40 °C y 75% de humedad relativa) y a largo plazo (12 meses a 25 °C y 60% de humedad relativa) sobre los comprimidos de la formulación 52/1 envasados en su envase primario óptimo (aluminio-aluminio) permiten establecer en 2 años (n+12) su periodo de estabilidad según las normas ICH.

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect*, 1985; 61: 97-110
- 2.- Duax WJ, Griffin JF, Weeks CM y Wawrzak Z. Mechanism of action of steroid antagonist: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem*, 1988; 31:481-492
- 3.- Stern MD. Pharmacology of conjugated oestrogens. *Maturitas*, 1982; 4:333-339
- 4.- Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Adv Modern Environ Toxicol*, Vol 21 Princeton Scientific Publishing. Princeton, New Jersey 1992.
- 5.- Guyton AC y Hall JE. Tratado de fisiología médica. Novena edición. Interamericana McGraw-Hill. Pag: 1120.
- 6.- Geynet C, Millet C, Truong H y Baulier EE. Estrogens and antiestrogens. *Gynec Invest*, 1972; 3:2-10
- 7.- García-Valdecasas F, Laporte J, Salvá JA, Cuenca E, Espulgues J, Bartolomé M, Forn J, Jané F, Brugger A, Erill S, Rodríguez L. Bases farmacológicas de la terapéutica medicamentosa. Barcelona: Salvat, 1969; pag. 89-111
- 8.- Wren BG. Oestrogen replacement therapy: The management of an endocrine deficiency disease. *Med J Aust*, 1985; 142(suppl):95-145

- 9.- Crane MG et al. Hypertension, oral contraceptive agents and conjugated estrogens. *Ann Intern Med*, 1971; 74:13-21
- 10.- Preffer RI. Estrogen use. Hypertension and stroke in post menopausal women. *J Chron Dis*, 1978; 31: 389-398
- 11.- Schwartz NB. Cybernetics of Mammalian Reproductions, en "Mammalian Reproductions", Gibian H and Plotz EJ Ed. Springer Verlag. Berlin, 1970:97-111
- 12.- Lin AL e al. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. *Circ Res*, 1982; 50: 610-616
- 13.- Lin AL et al. Estradiol-17 β effects estrogen receptor distribution and elevates progesterone receptor content in baboon aorta. *Arteriosclerosis*, 1986; 6:495-504
- 14.- Veland K y Parer JT. Effects of estrogens on the cardiovascular system of the ewe. *Ann J Obstet Gynecol*, 1966; 96:200-206
- 15.- Penny LL et al. 17- β estradiol stimulation of uterine blood flow in oophorectomized rabbits with complete inhibition of uterine ribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*, 1981; 109:1672-1676
- 16.- Nuwayhid et al. Effects of estrogens on system and regional circulations in normal and hypertensive sheep. *Ann J Obstet Gynecol*, 1975; 126:400-406
- 17.- Steinleitner A et al. Decrease "in vitro" production of 6-keto-prostaglandin by uterine arteries from postmenopausal women. *Ann J Obstet Gynecol*, 1989; 161:1677-1681
- 18.- Minor RL. Diet induced atherosclerosis increases release of nitric oxide from rabbit aorta. *J Clin Invest*, 1990; 86:2109-2116
- 19.- Collins P et al. Cardiovascular protection by oestrogen a calcium antagonist effect. *Lancet*, 1993; 341: 1264-65
- 20.- Weinstein L, Bewtra C y Gallagher JC. Evaluation of a continuous combined low-dose regimen of estrogen-progestin for treatment of the menopausal patient. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 162:1534-42
- 21.- Eriksen EF et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988; 241:84-86
- 22.- Christiansen C. Treatment of osteoporosis. En : Lobo RA (ed). *Treatment postmenopausal woman. Basic and clinical aspects*. New York: Raven Press, 1994; 183-95
- 23.- Santos GJ, Carranza LS. Clímax y enfermedad de Alzheimer. En: González CO, Contreras CP. *Menopausia y longevidad*. Bywaters Ediciones. Sociedad Chilena de climaterio, Santiago de Chile 1998:133-142

- 24.- Malarkey WB, Burleson M, Cacioppo JT et al. Differential effects of estrogen and medroxyprogesterone on basal and stress-induced growth hormone release, IGF-1 levels, and cellular immunity in postmenopausal women. *Endocrine*, 1997; 7:227-233
- 25.- Cano SA. Conceptos de receptores esteroides. Receptores de estrógenos, progestágenos y andrógenos en los tejidos femeninos. En: Palacios S. *Climaterio y menopausia*. Madrid: Mirpal, 1994: 34-46
- 26.- Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen on the vessel wall. *Biochem Pharmacol*, 1996; 51:571-576
- 27.- Ruder HJ, Loriaux L y Lipsett MB. Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest*, 1972; 51:1020-1033
- 28.- Powers MS, Schenkel L, Darley PE, Good WR, Balestra JC y Place VA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of transdermal dosage forms of 17- β -estradiol: comparison with conventional oral estrogens used for hormone replacement. *Am J Obstet Gynecol*, 1985; 152:1099-1106
- 29.- The American College of Obstetrician and Gynecologist. Hormone replacement therapy. ACOG Educational Bulletin nº 247. Washington DC. 1998
- 30.- Kronenberg F. Hot flushes; epidemiology and physiology. *Ann NY Acad Sci*, 1990; 592:52-86
- 31.- Rosenthal HE et al. Binding of estrone sulfate in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1972; 34:805-13
- 32.- Pan CC et al. Transport of equine estrogens: binding of conjugated and unconjugated equine estrogen with human serum proteins. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985; 61: 499-506
- 33.- Fotherby D, James F. Metabolism of synthetic steroids. *Adv Steroid Biochem Pharmacol*, 1972; 3:67-165
- 34.- Carranza S. *Terapia Hormonal de Reemplazo*. McGraw-Hill Interamericana Editores. México, 2000: 21-24.
- 35.- Jul, H. Pharmacokinetics of oestrogens and progestogens. *Maturitas*, 1990; 12: 171-197
- 36.- Bhavnani BR et al. metabolismo of (3H)-equilina- (35S) sulfate and (3H) equilin sulfate after oral and intravenous administration in normal postmenopausal women and men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989; 68:757-65
- 37.- Bhavnani BR et al. Radioimmunoassay of plasma equilin and estrone in postmenopausal women after the administration of premarin ®. *J Clin Endocrinol Metab*, 1981; 52: 741-7

- 38.- Wittacker PG et al. Serum equilin, oestrone and oestradiol levels in postmenopausal women receiving conjugate equine estrogens (Premarin ©). *Lancet*, 1980; 1:14-16
- 39.- USP DI Vol I 1984. Drug information for the health care provider, 489. United States Pharmacopoeial Convention Inc.
- 40.- Hammond CB, Maxson WS. Estrogen replacement therapy. *Clin Obstet Gynecol*, 1986; 29: 407-30
- 41.- Belchetz PE. Hormonal therapy of menopausal women. *N Engl J Med*, 1994; 330:1062-1071
- 42.- Tevelde ER y Can Leusden HAIM. Hormonal treatment for the climateric: Allevation of symptoms and prevention of postmenausal disease. *Lancet*, 1994; 343: 654-658
- 43.- Campbell S y Whitehead M. Estrogen therapy and the postmenopausal syndrome. *Clin Obstet Gynecol*, 1977; 4:31-47
- 44.- Nelson HD. Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment of hot flashes. *JAMA*, 2004; 291:1610-1620
- 45.- Rakel RE y Bope ET: *Conn's Current Therapy*. Saunders Company. Philadelphia 2002
- 46.- Lindsay R. "The role of oestrogen replacement therapy in the prevention of osteoporosis. Proceedings of a symposium on estrogen replacement therapy. San Francisco, Chicago: Abbot Laboratory, Ogen Round table Conference 1984.
- 47.- Aitken JM et al. Oestrogen replacemenr therapy for prevention of osteoporosis after oophorectomy. *BMJ*, 1973; 3: 515-518
- 48.- Al-Azzawi F et al. Long term effect of oestrogen replacement therapy on bone mass as measured by dual photon absorptiometry. *BMJ*, 1987; 294:1261-2
- 49.- Lindsay R. Estrogen ad osteoporosis. En: Stevenson JC, Lindsay R (eds). *Osteoporosis*. London: Chapman and Hall Medical, 1998, 161-71
- 50.- Weis NS et al. Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen. *N Engl J Med*, 1980; 303: 1195-8
- 51.- Ettinger B et al. Long-term estrogen reemplacemnt therapy prevents bne loss and fractures. *Ann Intern Med*, 1985; 102:319-324
- 52.- Gordan GS et al. Antifracture efficacy of long-term estrogens for osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians*, 1973; 86:326-32
- 53.- Hutchinson TA et al. post-menopausal oestrogen proctec against fractures of hip and distal radius: A case-control study. *Lancet*, 1979; 2: 705-9

- 54.- Paganini-Hill A. et al. Menopausal estrogen therapy and hip fractures. *Ann Intern Med*, 1981; 95: 28-31
- 55.- Crosbie D, Reid D. Managing osteoporosis. *The Practitioner*, Oct 2004 248:749-752
- 56.- Stumpf PG. Pharmacokinetics of estrogen. *Obstet Gynecol*, 1990; 75(suppl); 95-145
- 57.- American College of Obstetricians and Gynecologist. Women's Health Care Physicians. Vasomotor symptoms. *Obstet Gynecol*, 2004; 104(4 suppl):1065-1175
- 58.-Ettinger B et al. Postmenopausal bone loss is prevented by treatment with low-dosage estrogen with calcium. *Ann Intern Med*, 1987; 106:40-5
- 59.- Bath PMW, Gray LG. Association between hormone replacement therapy and subsequent stroke: a meta-analysis. *BMJ*, 2005; 330:342-344
- 60.- Anderson G, Limacher M. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA*, 2004; 291: 14(1701-1712)
61. Cushman M, Kuller L, Prentice L. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA*, 2004; 292: 13(1573-1580)
- 62.-Manson JE, Hsia J, Johnson K. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*, 2003; 349:523-34
- 63.- Grady D, Wenger NK, Herrington D et al. Postmenopausal hormone replacement therapy increases risk for venous thrombolism disease:the heart and estrogen/progestin replacement stdy. *Ann Intern Med*, 2000; 132:689-96
- 64.-Rymer J, Wilson R, Ballard K. Making decisions about hormone replacement therapy. *BMJ*, 2003; 326:322-326
- 65.- Herbst A, Ulferder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med*, 1971; 284:878-881
- 66.- Greenwald P, Barlow JJ, Nasc PC et al. Vaginal cancer after maternal treatment with synthetic estrogens. *N Engl J Med*, 1971; 285:390-392
- 67.- Herbst A, Kurman RJ, Scully RE: Vaginal and cervical abnormalities after exposure to stilbestrol in utero. *Am J Obstet Gynecol*, 1972; 40:287-298
- 68.- Ziel HK et al. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med*, 1975; 293:1167-70
- 69.- Henderson BE. The cancer question: An overview of recent epidemiologic and retrospective data. *Am J Obstet Gynecol*, 1989; 161:1859-64

- 70.- Whitehead MI, Fraser D. Controversies concernig the safety of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*, 1987; 156:1313-22
- 71.- De Lignieres B, Moyer DL. Influence of sex hormones on Hyperplasia/Canciroma risks. En: Lobo RA (ed). *Treatment of the postmenopausal women. Basic and clinical aspects.* new York: Raven Press, 1994, pag 373-83
- 72.- Whitehead MI et al. Effects of estrogens and prtogestins on the bichemistry and morphology of the postmenopausal endometrium. *N Engl J Med*, 1981; 305:1599-1605
- 73.- Voigt LF et al. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. *Lancet*, 1991; 338:274-7
- 74.- Persson I, Adami HO, Berkuist L, Lindgren A, Pettersson B, Hoover R, Schairer C. Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens:results of a prospective study. *Brit Med J*, 1989; 298:147-151
- 75.-Beresford SAA, Weiss NS, Voigt LF, McKnight B. Risk of endometrial cancer in relation to use of oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *Lancet*, 1997; 349:458-61
76. Beral V, Bull D Reeves G. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 2005; 365:1543-1551
- 77.- Grambell RD, Massey FM, Castaneda TA, Ugenas AJ, Ricci CA, Wright JM. Use of the progestogen challenge test to reduce the risk of endometrial cancer. *Am J Obstet Gynaecol*, 1980; 55:732-738
- 78.- Chlebowski RT, Hendrix S, Langer R.Influencia de estrógenos y progestágenos sobre el cancer de mama y la mamografía en mujeres posmenopáusicas sanas. *JAMA*, 2003; 289:3243-3253
- 79.- Li C, Malone K, Porter. Relación entre duraciones prolongadas y diferentes regímenes de traamiento hormonal y riesgo de cáncer de mama. *JAMA*, 2003; 289:3254-63.
- 80.- Notelovitz M. Estrogen replacement therapy: indications contraindications and agent selection. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1832-1841
- 81.- Miller KL. Alternatives to estrogen for menopausal symptoms. *Clin Obstet Gynecol*, 1992; 35:884-93
- 82.- Real Farmacopea Española (RFE) 3^{era} edición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 2005: 1539-1541
- 83.- Farmacopea europea 5^a edición. Strasbourg, 2006: 1539-1541
- 84.- Vilajato JL. Tecnología Farmacéutica. Volumen II. Ediciones Síntesis. Madrid, 1997:379-417

- 85.- Suñe Negre JM, Tico Grau JR, García Montoya E, López Paz S, Pacheco Molina JA, Miñarro Carmona M, Aparici Dealbert M y Roig A: Diseño y elaboración de nuevas formas farmacéuticas en La recerca a la Facultat de Farmàcia de Barcelona coordinada por M. Viñas Ciòrdia. Editorial PPU S.A. Barcelona, 1996; pag.:487-497.
- 86.- Jover Coll I, García Montoya E, Miñarro Carmaona M, Pérez Lozano P, Orriols Reig A, Suñe Negre JM y Ticó Grau JR. Formas de liberación modificada. Cienc Tecnol Pharm 2003; 13(4):129-135.
- 87.- Ticó Grau JR, García Montoya E, Orriols Reig A, Miñarro M, Pérez Lozano y Suñe JM: Comprimidos osmóticos. El farmacéutico Hospitales, 2004; 158:32-44.
- 88.- Ticó JR: Formas farmacéuticas solidas orales de liberación modificadas en: Faulí i Trillo C: Tratado de farmacia galénica. 1^{era} Edición. Editorial Luzan. Madrid, 1993: 599-607
- 89.- Pacheco Molina JA, Miñarro Carmona M, Suñe Negre JM y Tico Grau JR: El comprimido osmótico bicompartimental. Ciencia Pharmaceutica, 1995; 5(3):115-122
- 90.-Miñarro M, Pacheco JA, García Montoya E, Suñe Negre JM y Ticó Grau JR:Aspectos tecnológicos de las formas farmacéuticas de liberación modificada de administración oral: sistemas matriciales, flotantes y bioadhesivos. Ciencia Pharmaceutica 1997; 7(5): 219-226
- 91.- Suñe Negre JM, Jurado Sánchez F, Lizcaino García J, Salvadó Lladós MA García Celma MJ y Miró Princep ML. Estudio galénico y de estabilidad a tiempo real de distintas especialidades farmacéuticas de comprimidos de paracetamol. Ciencia Pharmaceutica, 1992; 2(6): 401-410
- 92.- Johson, Masserano R, Haring R et col. Quantitative GLC determination of conjugatd estrogens in raw materials and finished dosage forms. Journal Pharmaceutical Sciencies, 1975; 64(6): 1007-1011
- 93.- Pillai GK, McErlane. Quantitative determination of conjugates estrogens in formulations by capillary GLC. Journal Phamaceutical Sciences, 1981; 70(9):1072-1074.
- 94.- Fishman S. Determiantion of estrogen in dosage forms by fluorescence using dansyl chloride. Journal Pharmaceutical Sciences 1975; 64(4):674-676
95. Carignan G, Lodge BA. Comparison of acidic and enzymatic hydrolysis procedures for identification of natural estrogens in pharmaceutical preparation. Journal Pharmaceutical Sciences 1980; 69(12): 485-490
- 96.- Roos RW, Lau-Cam CA. Liquid Chromatography analysis of conjugated and esterified estrogens in tablets. Journal Pharmaceutical Sciences 1985; 74(2):201-205

- 97.-United States Pharmacopoeia (USP) 29th rev. US Pharmacopeial Convention Rockville, MD, 2006: 2106-2109
98. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC: Handbook of pharmaceutical excipients. 5^a edición. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. London UK, 2006.
- 99.-Farmacopea Europea 5^a edición. Volumen 5.3. Strasbourg, 2006: 3575
- 100.- Guidelines on General Principles of process Validation. Food & Drug Administration. Mayo 1987.
- 101.- Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Barcelona 2001.
- 102.- Validation: Definitions. Guideline on validation of analytical procedures: Definition and terminology. Step 7. CVMP/VICH/590/98. European Medicines Agency, London, UK, 1998.
- 103.- Validation Methodology, Guideline on validation of analytical procedures: methodology, step 7, CVMP/VICH/591/98. European Medicines Agency, London, UK, 1998.
- 104.- Pérez Lozano P, García Montoya E, Orriols A, Miñarro M, Ticó JR y Suñe JM: Application of a Validated Method in the Stability Study of Colistin Sulfate and Methylparaben in a Veterinary Suspension Formulation by High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector. J Pharm Biomed Anal, 2005; 39: 920-927.
- 105.- Pérez Lozano P, García Montoya E, Orriols A, Miñarro M, Ticó JR y Suñe JM: Application of a Validated Method in the Stability Study of Colistin Sulfate and Methylparaben in a Veterinary Suspension Formulation by High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector. J Pharm Biomed Anal, 2004; 34:979-987
- 106.-Peer Verified methods Program AOAC (Association of Analytical Communities). Manual on policies and procedures. Arlington, USA. Nov 1993.
- 108.- Guideline on stability testing of new drug substance and medicinal products. EMEA/CVMP/ICH/2736/99, European Medicines Agency. London, UK, 2001.
- 109.- Note for guidance on stability testing of existing active substance and related finished products. EMEA/CVMP/846/99. European Medicines Agency. London, UK, 2002.